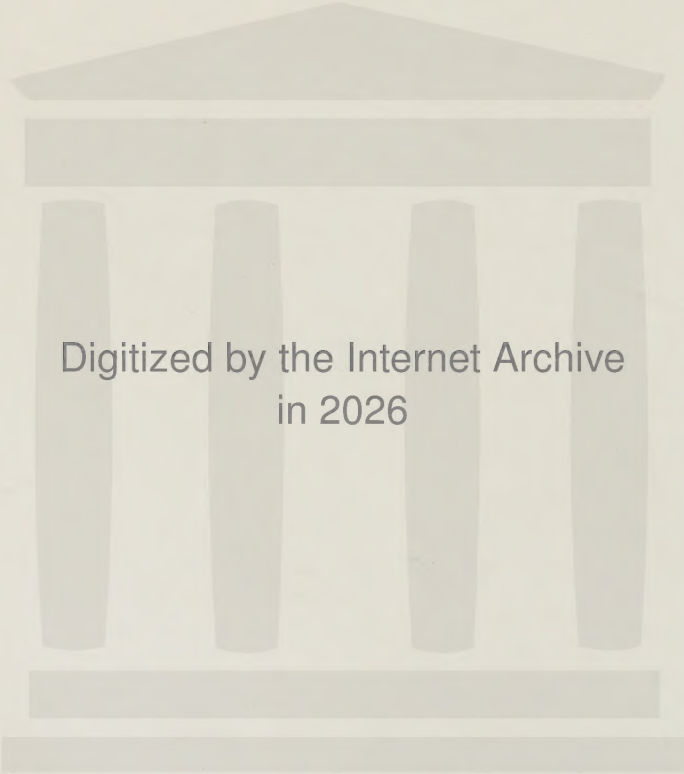


**BEOBACHTUNGEN BEI DER HERSTELLUNG VON
TOLLWUT-HYPERIMMUNGLOBULIN AM MENSCHEN
NACH IMPFUNG MIT EINER GEWEBEKULTURVAKZINE**

Correlli Barsenbach

*Duss München
1903*





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554007_0092

Aus dem Institut für Medizinische Virologie und Immunologie
der Universität Essen - Gesamthochschule
Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. vet. Ernst Kuwert

vorgelegt über

das Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Professor Dr. DDr. h. c. Anton Mayr

**BEOBACHTUNGEN BEI DER HERSTELLUNG VON
TOLLWUT-HYPERIMMUNGLOBULIN AM MENSCHEN
NACH IMPFUNG MIT EINER GEWEBEKULTURVAKZINE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Correlli Barsenbach
aus Colombo

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan : Prof. Dr. G. Terplan

Referent : Prof. Dr. DDr.h.c. A.Mayr

Korreferent : Prof. Dr. Dr.h.c. J.Boch

Tag der Promotion : 25. Februar 1983

It is even to be doubted whether any of the many diseases which afflict humanity, and are a source of dread, either because of their painfulness, their mortality or the circumstances attending their advent and progress can equal this (rabies) in the terror it inspires in the minds of those who are cognisant of its effects and who chance to be exposed to the risk of its attack, as well as the uniform fatality which terminates the distressing and hideous symptoms that characterize the disorder.

George Fleming.

Rabies and hydrophobia: their history, nature, causes and prevention (1872).

Abkürzungen

Ag:	Antigen
Ag CH 50:	50 % haemolysis antigen
Ak:	Antikörper
AW:	Antigenwert
BHK:	Baby Hamster Kidney
BPL:	Betapropiolaktation
BSA:	Bovine-Serumalbumen bzw. Rinderserumalbumen
CEV:	Chick embryo vaccine
CFU:	Complement Fixing Units
CH 50:	50 % haemolytic unit of Complement
CVS:	Standard Challenge Virus Stamm
EEV:	Entenembryovakzine
FFD:	Fluorescent Focus Dose
FFID:	Fluorescent Focus Inhibition Dose
FR:	Früh-Reaktand
HEP:	Flury High Egg Passage
HEV:	Hühnerembryovakzine (entsprechend auch CEV)
HIS:	Hyperimmunserum
IE:	Internationale Einheiten (entsprechend IU)
Ig:	Immunglobulin
IU:	International Units
MLD:	Minimale letalen Dosis
MR::	Mittel-Reaktand
NIH:	National Institute of Health
PBS:	Phosphatgepuffertes Saline
PM:	Pitman Moore Stamm (entsprechend auch PV)
PV:	Pasteur-Virus
RIGH:	Human rabies Immunglobulin (Menschliches Tollwut Ig)
SMGV:	Säuglingmäusegehirn-Vakzine
SN:	Serumneutralisierend
SR:	Spät-Reaktand
TNBP:	Tri-n-butyl-phosphat
TW:	Tollwut
V:	Virus
WHO:	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Aktive Immunisierung	5
I Ältere - Vakzinen	5
II Gewebekultur - Vakzinen	6
a. Zellkultur-Vakzinen tierischen Ursprungs	6
1. Hamsternierenzellen	6
2. Primär Schafnierenzellen	7
3. Hühnerembryozellen	7
4. Primär Rindernierenzellen	7
5. Primär Rinderfötalnierenzellen	7
b. Zellkultur-Vakzinen menschlichen Ursprungs	8
1. HDCS (Wi 38)	8
2. HDCS (MRC 5)	8
1. Wi 38 - Vakzine	8
a. Historisches	8
b. Vakzineformen und -eigenschaften	10
c. Immunisierungsstudien	11
2. MRC 5 - Vakzine	12
3. HDCS-Impfstudien im Überblick	13
C. Passive Immunisation	25
I Die Geschichte und Entwicklung des TW-HIS in der TW-Schutztherapie	25
II Probleme bei der Kombination HIS/Vakzine-Therapie	27
a. Serumkrankheit	27
b. Immunsuppression	28

III Entwicklung des TW-Ig human Provenienz	30
IV Vorteile des TW-Ig human Provenienz	32
V RIGH und der Interferenz- Phänomenon	33
D. Materialien und Methoden	35
a. Material	35
I Virusstämme	35
II Zelllinie	35
III Versuchstiere	35
IV Schafererythrozyten	35
V Komplement	35
VI Vakzinen	36
VII Seren	36
a. Tierseren	36
b. Humanseren	36
1. Negative Kontrollseren	36
2. Positive Kontrollseren	36
3. Probandenseren	37
VIII Pufferlösungen, Nährmedien, sonstige Lösungen	39
b. Methoden	41
I KBR	41
II MNT	42
III RFFIT	45
IV Herstellung von Gebrauchs- viruspools	49
1. CVS 11 (Mäusegehirnadap- tierter Stamm)	49
2. CVS 11 (BHK 21 adaptierter Stamm)	50
3. Immunfluoreszenz - TWV (Bild)	51

E.	Ergebnisse	52
	I Methodenvergleich	52
	II Postvakzinale Reaktionen	64
	III Kinetik der Antikörperbildung beim HDGS geimpften Plasma- spendern	64
	a. Prävakzinaler Immunstatus	64
	b. Postvakzinaler Immunstatus	64
	IV Antigenwert (AW) der Vakzine mit Antikörperbildung	76
	V Einfluß der Plasmapherese auf die Antikörperbildung	78
	VI Unterschiedliche Antikörper- bildung bei einzelnen Plasma- spendern	81
F.	Diskussion	91
G.	Zusammenfassung	101
	Summary	103

Literaturverzeichnis

- Anhang 1
- Anhang 2
- Anhang 3
- Anhang 4

A. Einleitung

Die Tollwut (TW) ist eine virale Zoonose. Die Bedeutung dieser Zoonose auch für das Altertum läßt sich schon aus der Tatsache ableiten, daß Hinweise auf diese Erkrankung beim Menschen bereits in dem 2000 vor Christus geschriebenen "Eschnunna Code" enthalten sind (Tierkel 1971 (166)) und Aristoteles (10) die Krankheit bei Hunden beobachtet hat.

Das infektiöse Agens dieser Erkrankung ist ein zur Gruppe der Rhabdoviren gehörendes Virus.

Es wird im Prinzip durch den Biß von Tieren in den menschlichen Organismus eingeschleust. Das Virus besitzt eine Prädisposition für das Nervengewebe, wobei möglicherweise der Grund für diese Prädisposition in der Bindung des Virus an Acetylcholinrezeptoren des menschlichen Nervengewebes liegt (Lentz et al. 1982 (113 a)), und führt nach dem Eindringen in das Zentralnervensystem zu einer nicht mehr therapeutisch beeinflussbaren und damit letal ausgehenden Entzündung des Gehirns und Rückenmarks. Der unausweichlich tödliche Ausgang der Erkrankung verursacht weltweit große Furcht vor der Tollwut.

Mit Ausnahme von Neuseeland (Claxton 1966 (33), Abdussalam und Botton 1974 (3)) kommt die Krankheit in fast allen Ländern der Erde vor. Australien ist seit 1867, Großbritannien und Nordirland sind seit 1922 frei von der Krankheit (Abdussalam und Botton 1974 (3), Wright 1978 (195)). In Asien - in Malaysia und Japan (Claxton 1966 (33), Shimada 1971 (151)) - ist die Krankheit z. Zt. ausgerottet.

Epizootiologisch existieren zwei Erscheinungsformen der Krankheit: Die Sylvatische Form, an der primär Wildtiere erkranken und die Urbane Form, von der primär Haustiere



befallen werden. Die Urbane Form überwiegt in Asien, Afrika und Südamerika und hat als prinzipiellen Vektor den Hund (Abdussalam und Botton 1974 (3)). In Nordamerika hat die Sylvatische die Urbane Form mehr oder weniger ersetzt; Vektoren der wilden Form sind hier der Rotfuchs, der gestreifte oder gefleckte Skunk, der Waschbär und die insektenfressende Fledermaus. In Zentral- und Südamerika wurde die blutleckende Fledermaus als hauptsächlicher Virusträger identifiziert.

Die Weltgesundheitsorganisation (1978 (181)) hat 4 epizootiologische Formen in Europa unterschieden. Diese sind

1. Sylvatische Tollwut in Zentraleuropa - Vektor und Reservoir ist der Rotfuchs;
2. Urbane Tollwut (Hund) in Südosteuropa und im Mittelmeergebiet;
3. Hunde-Tollwut und Foki der Wildtollwut in mehreren Ländern in Ost- und Südosteuropa;
4. Arktische Tollwut in Grönland und in der Arktischen Zone der UdSSR- das Reservoir ist der arktische Fuchs.

Die tödliche Bedrohung, die von dieser Krankheit ausgeht, veranlaßt die Menschheit immer wieder dazu, nach Wegen zu suchen, sich gegen die Krankheit zu schützen. Letztendlich führt nur die aktive Immunisierung mit dem Virus zu einem dauernden Schutz.

Der erste wirksame TW-Impfstoff wurde vor einem Jahrhundert von Pasteur et al. (1882 (132)) hergestellt. Pasteur und seinen Mitarbeitern war allerdings nicht bekannt, daß dieser Impfstoff aufgrund der Verunreinigung mit tierischem Nervengewebe sehr schwere Gehirn- und Nervensystemschäden (Linzenmeir und Kuwert 1970 (114), Kuwert et al. 1968 (101), Winkler 1964 (192), Appelbaum et al. 1953 (8), Blatt und Lepper 1953 (24), Janssen 1970 (81))) hervorrufen kann.

Diese Situation änderte sich grundlegend mit der Einführung der Gewebekulturvakzine, insbesondere der Human Diploid Cell Strain (HDCS) Vakzine. Die prä- und postexpositionelle Immunprophylaxe gegen die TW erfuhr damit eine neue Dimension, da diese Vakzine zusätzlich zu der hervorragenden Schutzwirkung eine ausgezeichnete Verträglichkeit aufweist. Von 800 postexpositionell vakzinieren Personen und einer Gesamtzahl von 150.000 prä- und postexpositionellen Impfungen ist kein Fall einer stärkeren neurologischen oder systemischen postvakzinalen Komplikation bekannt geworden. ,

Nach der postexpositionellen Therapie ist kein einziger Impfdurchbruch aufgetreten (WHO meeting Essen 1980 (184)).

Trotz des durch die HDCS-Vakzine relativ früh induzierten Schutzes (Bahmanyar et al. 1976, 1974 (20, 21), Kuwert et al. 1976 (104), Tint 1977 (168 a), Thraenhart und Kuwert 1977, 1979 (163, 164)), verbleibt eine Zeitspanne von 5 - 7 Tage, in der insbesondere im Hinblick auf den Schutz exponierter Personen die passive Immunisierung, d. h. die Verabreichung von TW-Hyperimmunserum (HIS), unumgänglich ist (Habel und Koprowski 1955 (62), Habel 1966 (64)).

Mit der Einführung der Plasmapherese ergab sich die Möglichkeit, menschliche TW-Immunglobuline (TW-Ig) in großer Menge und relativ rein zu gewinnen. Das auf diese Weise gewonnene TW-HIS verdrängt in den letzten Jahren zunehmend HIS tierischer Herkunft.

In dieser Arbeit soll versucht werden, die Kinetik der Antikörper (Ak)-Bildung im Serum von Plasmaspendern, die zur Gewinnung menschlichen TW-HIS mit der HDCS-Vakzine immunisiert wurden, zu verfolgen. Folgende Gesichtspunkte werden berücksichtigt:

1. Einfluß der Plasmapherese auf den Verlauf der Immunantwort.

2. Unterschiedliche Ak-Bildung bei einzelnen Personen.
3. Einfluß des Antigenwertes der HDCS-Vakzine auf den Verlauf der Immunantwort.

Die quantitative Erfassung der Ak-Bildung und Ermittlung des Antigenwertes erfolgte mittels Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR), Mausneutralisationstest (MNT) und Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT). Um den RFFIT sinnvoll einsetzen zu können, war es notwendig, diese Methode zu standardisieren.

Zunächst wird die Entwicklung, die zur HDCS-Vakzine führte, dargestellt und näheres über diese Vakzine berichtet, da sie Impfstudien dieser Art ohne Gefahr für den Spender überhaupt erst ermöglicht hat. Sodann wird der selektive und additive Wert der passiven Immunisierung bei der immunologischen postexpositionellen Therapie diskutiert.

B. Aktive Immunisierung

I Ältere - Vakzinen

Die frühere Behandlung der TW bestand in der Kauterisation der Bißverletzung mit einem heißen Eisen (Jeunhomme 1924 (82)). Der erste TW-Impfstoff, der aus fixiertem (abgeschwächtem d. h. beim Menschen nicht mehr zum Tode führenden) TW-Virus (TWV) bestand, wurde vor einem Jahrhundert von Pasteur et al. 1882 (132) entwickelt, und 1885 (133 a) wurde zum ersten Mal ein Mensch damit gegen TW geimpft. Pasteur und seinen Mitarbeitern war nicht bekannt, daß dieser Impfstoff auf Grund der Verunreinigung mit tierischen Nervengewebe sehr schwere und manchmal dauerhafte Gehirn- und Nervensystemschäden (Linzenmeir und Kuwert 1970 (114), Kuwert et al. 1968 (101), Winkler 1964 (192), Appelbaum et al. 1953 (8), Blatt und Lepper 1953 (24)) hervorrufen kann. Diese neuroparalytischen Nebenwirkungen, die auch zum Tode führen können (Janssen 1970 (81)), waren auf das Vorhandensein eines mit Myelin assoziierten Enzephalitogens im Gehirn der geimpften erwachsenen Tiere zurückzuführen und wurden mit einer Häufigkeit von 1:1600 (mit tödlichem Ausgang von 1:11000) beobachtet (Abdussalam und Bögel 1971 (2)). Daher wurde neben Versuchen, die Vakzine zu reinigen (Lavender 1970 (110), Kaplan und Turner 1968 (89), Sikes und Larghi 1967 (152)), nach besseren Substraten für die Herstellung des Vakzinevirus gesucht.

Da der enzephalitogene Faktor bei unreifen Tieren im Gehirngewebe nicht vorhanden sein soll (Kabat et al. 1947, 1948 (83, 84)), wurde dieses Gewebe als Substrat (Mäuse (Säuglingsmausgehirnvakzine (SMGV)), Ratten, Kaninchen) für die Herstellung der Vakzine verwendet (Fuenzalida und Palacios 1955 (56), Gispén et al. 1965 (57, Gispén und Saathof 1965 (58), Svet-Moldavskij 1965 (162)). Allerdings wurde dieses Gewebe später auch als enzephalitogen beurteilt (Toro et al. 1977 (168), Varela et al. 1974 (173), Held und Lopez 1972 (71, Lopez und Held 1975 (116), Para

et al. 1955 (131), Trejos et al. 1971 (169)).

Embryonale Gewebe von Vögeln Hühnerembryo-Vakzine (HEV) bzw. Entenembryo-Vakzine (EEV) (Koprowski und Cox 1948 (46)), Powell et al. 1950 (136), Peck et al. 1955 (133)) ergaben nur schwach immunogene Vakzinen (Ellenbogen und Slugg 1973 (47), Plotkin und Clarke 1971 (134), Crick und Brown 1970 (39), Tierkel und Sikes 1967 (165), Farrar et al. 1964 (49), Atanasiu et al. 1957 (12), Fox et al. 1957 (55)).

II Gewebekulturvakzinen

Die Züchtung des TWV in Kulturen embryonalen Nervengewebes ist in einer Übersicht von Sanders et al. 1953 (142) beschrieben worden. Die erfolgreiche Züchtung des TWV in Gewebekulturen nicht-neuralen Ursprungs gelang erstmalig Kissling (1958, (91)) durch Fortpflanzung des "Virus fixe" und des "Straßen-Virus" auf Primär-Baby-Hamsternieren (Baby Hamster Kidney (BHK)-Zelllinien).

Der derzeit geltende Standard bezüglich der Verwendung von Zelllinien zur Herstellung von Vakzinen schließt die Verwendung heteroploider Zelllinien (Tumorbildung: Westwood et al. 1957 (175)) sowie Zelllinien erwachsener Tiere (Expression latenter Viren (Hull (79)) aus.

a. Zellkultur-Vakzinen tierischen Ursprungs

Die folgenden Zellkulturen tierischen Ursprungs sind zur Herstellung der TW-Vakzinen verwendet worden.

1. Hamsternierenzellen (Fenje und Pinteric 1966 (50), Selimov und Aksenova 1969 (146)) sind in Kanada und in der UDSSR verwendet worden. Der kanadische Impfstoff wurde 1968 für die präexpositionelle Anwendung beim Menschen zugelassen. Das Impfstoff-Virus war der durch Formaldehyd inaktivierte

TWV-Stamm Clone 60 (Cl-60) (Fenje 1974 (51)). In der UDSSR wurden primäre syrische Hamsternierenzellen mit abgeschwächtem TWV des Stammes Vnukovo 32 infiziert. Die Inaktivierung erfolgte durch Ultraviolettbestrahlung (UV). Der Impfstoff wurde für die postinfektionelle Impfung in der UDSSR zugelassen. Auffällig ist bei diesem Impfstoff das Impfschema, wobei weder die Dosis in Menge und Anzahl (1,5 - 25 Tage) noch die Verabreichungszeitpunkte exakt definiert sind (Selimov et al. 1978 (148 a), Selimov und Aksenova 1966 (145)).

Die Vakzine wurde außerdem in Ungarn, Bulgarien, Polen und in der DDR eingeführt, hier allerdings mit einem veränderten Impfschema (Selimov et al. 1978 (148)).

2. Primäre Schafsnierenzellen (Selimov und Aksenova 1969 (146)).

3. Hühnerembryozellen (Kondo et al. 1974 (94)).

Der 'Flury High Egg Passage (HEP)' Stamm des TWV wurde auf Kükenembryofibroblasten (Kondo 1965 (94 a)) adaptiert, mit Betapropiolaktin (BPL) inaktiviert und durch Ultrafiltration und Ultrazentrifugation (Kondo 1978 (95)) gereinigt und konzentriert.

4. Primäre Hundenierenzellen (von Wesel und von Steenis 1978 (176)) werden mit dem Pitman Moore (PM) Stamm des Virus infiziert und in "microcarrier" Kulturen gezüchtet. Das Virus wird mit BPL inaktiviert, durch Ultrafiltration konzentriert und auf Sepharose B gereinigt. Die Vakzine ist nur zum Gebrauch unter "kontrollierten Voraussetzungen" freigegeben worden.

5. Primäre Rinderfötalnierenzellen (Atanasiu et al. 1974 (16)) sind mit dem Pasteur-Stamm des Virus infiziert worden. Das Virus wird mit BPL inaktiviert und durch Zonalzentrifugation gereinigt (Atanasiu et al. 1978 (17)). Die Vakzine ist zur

Anwendung freigegeben worden (WHO Treffen 1980 (184)).

b. Zellkultur-Vakzinen menschlichen Ursprungs

Die folgenden menschlichen diploiden Zelllinien sind zur Herstellung des TW-Impfstoffes verwendet worden;

1. HDCS (Wi 38) : menschliche embryonale Lungenfibroblasten Wistar 38 (Wi 38) (Hayflick und Moorehead 1961 (70)).
2. HDCS (MRC 5) menschliche embryonale Lungenfibroblasten (Medical Research Council 5 (MRC 5), (Jacobs et al. 1970 (80)).

1. Wi 38-Vakzine

a. Historisches

Die HDCS-Wi 38 Zelllinie wurde im Wistar-Institute in Philadelphia - daher HDCS (Wi 38) - entwickelt (Hayflick und Moorehead 1961 (70)). Ihre Stabilität und Integrität sowie ihre Empfänglichkeit für Viren, die für Menschen pathogen sind, ist nachgewiesen worden (Herrman 1967 (73)). Dieser Zellstamm wurde für die Anzüchtung des TWV bei der Herstellung der Vakzine ausgewählt, weil die inhärenten Schwierigkeiten, die mit dem Gebrauch der primären Gewebekulturen verbunden sind, zum großen Teil vermieden werden können (Wiktor et al. 1978 (191)). Der PM-Stamm (auch Pasteur Virus (PV) genannt), wird bei der Produktion der Vakzine verwendet. Das Virus wird in der Division of Biological Standards, National Institute of Health, USA im Kaninchengehirn vermehrt und als offizielles US-TWV-Stammvirus für die Herstellung der Gehirngewebevakzine verwendet (Clarke und Wiktor 1972 (32)). Das PM-Virus stammt vom Original-PV, es wurde aus einem tollwütigen Hund isoliert und durch intrazerebrale Inokulierung in Kaninchen

vermehrt. Nach erfolgreicher Adaptierung des PM-Stammes des "Virus fixe" auf HDGS-Wi 38 Zellen (Wiktor et al. 1964 (185)) wurde das Virus weiter in dieser Zelllinie kultiviert. In Tabelle 1 ist die Geschichte der Entwicklung der PM/HDGS Vakzine aufgeführt.

Tabelle 1: Die Geschichte des PM/HDCS Virus-
vakzinestammes (Wiktor et al. 1978 (191))

Datum	Ereignis
Ursprung 28.01.1960	NIH PV-11
Oktober 1962	Zwei Passagen im Kaninchengehirn
November 1962	Infizierung der Wi 38-Zellen
November 1963	Adaptierung und 47 Passagen in Wi 38- Zellen
April 1965	Reinigung und Her- stellung der "Master Seed" Passage (52. Passage)

b. Vakzineformen und -eigenschaften

Drei Firmen stellen diese Vakzine her. Es sind: in Europa das Mérieux Institute in Lyon und die Behringwerke in der Bundesrepublik Deutschland; in den Vereinigten Staaten von Amerika wird die Vakzine von den "Wyeth Laboratories" in Philadelphia hergestellt. Die europäischen Vakzinen sind im wesentlichen gleich, da beide aus kompletten inaktivierten Virionen bestehen.

Bei dem Mérieux-Präparat wird eine Viruscharge durch Ultrafiltration konzentriert, durch eine 0,45 µm Zellolosemembran filtriert und mit BPL in einer Konzentration von 1 : 4000 24 Stunden bei 4°C und 2 Stunden bei 37°C inaktiviert. Das Endprodukt wird lyophilisiert (Nicolas et al. 1978 (128)).

Die Vakzine der Behringwerke wird zusätzlich gereinigt. Mehrere Viruschargen werden in dem "Continuous Flow Zonal Centrifugation"-Verfahren (Hilfenhaus et al. 1976 (75 a)) eingesetzt. Durch "Continuous Flow Isopyknic Banding" auf einem Sucrosegradienten wird das Virus gleichzeitig konzentriert und gereinigt und danach lyophilisiert (Majer et al. 1977 (121)).

Die amerikanische Vakzine ist eine "Split" oder "Subunit" (Untereinheit) Vakzine des W1 38 adaptierten PM TWV. Durch die Verabreichung eines hoch effektiven und selektiven Dispersions-Agens, nämlich Tri-n-butyl-phosphat (TNBP), wird das Virion gleichzeitig gespalten und inaktiviert. Dabei wird ein Immunogen freigesetzt (Tint et al. 1974 (167)). Zuerst werden mehrere Virusernten durch Membranfiltration konzentriert und die Konzentratpools (0,1 %-iges TNBP und Tween 80) bei 37°C inkubiert. In drei Tagen ist das Virus inaktiviert. Der Vorteil dieses Aufbereitungsverfahrens ist die verminderte Reaktivität im Vergleich zu den Gesamtvirusenthaltenden Vakzinen (Neurath et al. 1972 (127)).

Während der Entwicklung wurden umfangreiche Tierversuche mit der HDCS-Vakzine durchgeführt. Die ersten Experimente an Mäusen mit dem im konzentrierten Gewebekulturüberstand von PM-Virus infizierten menschlichen diploiden Zellen zeigten, daß nach BPL-Inaktivierung das Virus stärker immunogen ist als nach Phenol Inaktivierung (Wiktor et al. 1964 (185)). Rhesusaffen, die mit BPL-inaktivierter HDCS-Gewebekulturüberstand immunisiert wurden, zeigten eine bessere Antikörperantwort als mit BPL-inaktivierter EEV bzw. Flury HEP-Vakzine geimpfte Tiere (Wiktor und Koprowski 1965 (186)).

Gereinigte (Sokol et al. 1968 (159)) und konzentrierte (Wiktor et al. 1969 (187)), Aaslestead und Wiktor 1972 (1)) Gewebekulturüberstände ergaben bedeutend höhere Schutzaktivitäten, wobei Präparate manchmal 100-fach immunogener waren als die Referenz-Vakzine (Wiktor et al. 1969 (187)).

Weitere Versuche an Affen zeigten, daß nach Immunisierung mit experimentell konzentrierter BPL-inaktivierter PM/HDCS-Vakzine höhere Antikörpersniveaus erhalten wurden als nach Immunisierung mit Entenembryovakzine (EEV) oder Säuglingsmäusegehirnvakzine (SMBV). Eine einzige Injektion mit PM/HDCS-Vakzine verabreicht nach dem "Challenge" mit dem "Straßenvirus", schützte sieben von acht Affen (Sikes et al. 1971 (154)).

c. Immunisierungsstudien

1971 wurde der erste Mensch mit der HDCS-Vakzine gegen Tollwut geimpft (Wiktor et al. 1973 (190)). Verwendet wurde die "Wyeth Split-Vakzine". Die umfangreichen nachfolgenden Versuche an Menschen wiesen auf die gute Verträglichkeit der Vakzine hin. Plotkin et al. 1976 (135) berichteten über 9 % Nebenwirkungen mit EEV. Aoki et al. 1975 (7) verwendeten den intradermalen Impfmodus und beob-

achteten wenige Nebenwirkungen. Bei der Verwendung verschiedener Impfschemata ergab die Primär-Immunisierung gute Ergebnisse mit dem Auftreten neutralisierender Antikörper im Serum am 14. Tag (Turner et al. 1976 (170), Plotkin et al. 1976 (135), Wiktor et al. 1973 (190)) sowie am 10. Tag (Shah et al. 1976 (149)). Mit der HDCS-Vakzine geimpfte Personen wiesen einen 20-fach höheren Antikörpertiter auf als Impflinge, die die gleiche Dosiszahl EEV erhielten (Plotkin et al. 1976 (135)). Nach einer Vakzinedosis ist eine 100 % Serokonversion beobachtet worden (Aoki et al. 1975 (7), Cox et al. 1976 (37)).

Die Überlegenheit der Antigenität der HDCS-Vakzine gegenüber der EEV und der Hemptvakzine (Nervengewebevakzine nach Hempt) wurden ausführlich von Kuwert et al. 1976 (109) berichtet. Sie beobachteten schon am 7. Tag nach einer Verabreichung von 1 - 3 Dosen eine 100 %-ige Serokonversion, die bis zum 245. Tag nachweisbar war. Cox et al. 1976 (37) konnten ein rapides Ansteigen der Antikörpertiter nach der Applizierung von einzelnen intradermalen "Boosterdosen" nachweisen; die Antikörpertiter erreichten dabei ein Maximum am 14. Tag. Wiktor et al. 1973 (190) haben sieben Tage nach der Boosterinjektion eine 4-fache Steigerung der Antikörpertiter beobachtet. Die Applizierung der Booster-Injektion wurde subkutan vorgenommen. In einer späteren Studie ist von Cabasso et al. 1974 (28) eine 69-fache Steigerung der Antikörpertiter nach Anwendung der HDCS-Vakzine gegenüber einer 7-fachen Steigerung nach Anwendung der EEV beobachtet worden. Nach intradermaler Boosterung sind geringe örtliche Nebenwirkungen aufgetreten (Cox et al. 1976 (37)).

2. MRC 5 Vakzine

Wegen der größeren Wachstumsrate der MRC 5-Zelllinie wurde diese Vakzine als eine Alternative zu dem Wi 38 - Zellstamm empfohlen (Majer et al. 1977 (121)). Bei Impfungen mit der MRC 5-TW-Vakzine konnte eine 100 %-ige Serokonversion am 21. Tag bei einer präexpositionellen Studie und am 14. Tag bei

einer postexpositionellen Studie (Cox et al. 1978 (38), Klietmann et al. 1978 (92)) beobachtet werden.

3. HDGS-Impfstudien im Überblick

Für die Verwendung der HDGS-Vakzine in der präinfektionellen Prophylaxe sind mehrere unterschiedliche Dosis-Impfschemata in vielen klinischen Versuchen in Europa, Amerika, den Britischen Inseln und einigen Ländern Asiens von verschiedenen Arbeitsgruppen erprobt worden. Diese Arbeiten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bewiesen wurde die Wirksamkeit der HDGS-Vakzine zum ersten Mal bei der postexpositionellen Therapie durch die erfolgreiche Behandlung

- a) von 108 Personen in der Bundesrepublik Deutschland, die von TW-infizierten oder TW-verdächtigen Katzen und Hunden gebissen worden waren und
- b) von 45 Personen im Iran, die von tollwütigen Wölfen gebissen worden waren.

Die Bundesrepublik ist im Jahre 1977 das erste Land gewesen, in dem die Vakzine zum postexpositionellen Gebrauch für die Tollwut-Therapie freigegeben wurde (Tabelle 3).

Das in Essen etablierte, und in Teheran von dem "WHO Expert Committee Group" (WHO 1975 (180)) akzeptierte postexpositionelle Impfschema besteht aus 6 Injektionen von jeweils 1 ml, appliziert am Tag 0, 3, 7, 14, 30 und 90. Abhängig vom Schweregrad und dem Ort der Verletzung wird "Human Rabies Immunoglobuline (RIGH)" (20 IU/kg Körpergewicht) simultan mit der ersten Vakzinedosis verabreicht. Nach einer erneuten Exposition genügt es, eine einzige Vakzinedosis zu verabreichen (Kuwert 1978 (108)).

Die bis heute durchgeführten postinfektionellen Impfstudien sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 2:

Präexpositionelle Impfstudien mit der HDCS-Vakzine bei freiwilligen Personen.

(+) = Antikörper (Ak)-Titer in Internationale Einheiten (IE)/ml.

AW = Antigenwert

Tag der Anzahl der Impf- Impfung Dosen	Tag der Booster- dosis	Tag der Ak-Be- stimmung nach 1. Vakzinedosis	Ak-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW	Literatur
0, 28, 56,	3 x 1 ml i/m	4 Wochen nach der letzten Dosis	$\geq 0,5$ IE/ml		Empfehlung WHO 1978 (181, 182)
0, 3, 7, 21,	4 x 1 ml i/m				
0, 34	2 x 1 ml i/m	14, 7, 36 Tage nach der 2. Dosis	$> 1:10$, --, 1:120		Wiktor et al. 1973 (190)
0,	1 x 1 ml i/m	3, 7, 21, 35	1, 2, 28, 31		Bahmanyar 1974 (20)
0, 1, 2, 3,	4 x 1 ml i/m	91 3, 7, 21, 35, 91, 104,	2, 5, 124, 165, 69, 1038		
0, 3, 7, 21,	4 x 1 ml i/m	91 "	0, 3, 300, 767, 112, 1340,		
0, 3, 7,	3 x 1 ml i/m	91 "	0, 1, 89, 95, 144, 268,		

Tag der Impfung	Anzahl der Dosen	Impf- modus	Tag der Booster- dosis	Tag der Ak-Bestimmung nach der 1. Vakzine- dosis	Ak-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW	Literatur
0,	1 x 1 ml	i/m	--	1, 3, 7, 14, 28, 56,	(+) <0.16, <0.16 <0.16, 0.04, 0.05, 0.28	10	Cabasso et al. 1974 (28)
0, 3,	2 x 1 ml	i/m	--	3, 7, 14, 28, 56,	--, <0.16, <0.16, 0.11, 0.86, 0.98		
0, 14,	2 x 1 ml	i/m	--	14, 28, 56,	0.08, 2.08, 1.42		
0, 28,	2 x 1 ml	i/m	--	1, 3, 7, 14, 28, 56, 70,	<0.16, <0.16 0.09, 0.55, 1.82, 2.00,		
0, 7, 14,	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 56,	<0.16, 0.14, 2.08 3.57		
0, 3, 28,	3 x 1 ml	i/m	--	3, 7, 14, 28, 56, 70,	<0.16, <0.16, 0.03, 0.56, 1.87 1.61,		
0, 14, 28,	3 x 1 ml	i/m	--	14, 28, 56, 70,	0.05, 0.26, 1.27, 0.95,		
0, 28, 56,	3 x 1 ml	i/m	--	14, 28, 56, 70, 84,	0.13, 0.15, 1.32, 4.75, >2.40,		
0, 7, 14, 28,	4 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 56, 70,	<0.16, 0.31, >4.22 6.4, 2.78,		
0, 7, 14, 28,	4 x 1 ml	i/m	--	1, 3, 7, 14, 28, 56, 70,	<0.16, <0.16, <0.16, 0.12, 0.69, 1.29		

Tag der Impfung	Anzahl der Dosen	Impf- modus	Tag der Booster- dosis	Tag der Ak-Bestimmung nach der 1. Vakzine- dosis	Ak-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW	Literatur
0, 28	2 x 1 ml	i/m	--	28, 56	2.62, 7.18 (+)		Aoki et al. 1975 (7)
0, 28	2 x 0,1 ml	i/d	--	"	3.61, 6.87		
0,	1 x 1 ml			7, 14-21 Tage nach der 2. Dosis	0.1 (5%), 0.1- 0.3, (50%-80%)	1.5-5.0	Tint 1975 (persön- liche Mit- teilung)
In Abstän- de von einige Tagen/ Wochen	2 x 1 ml			7 - 10 Tage nach der 2. Dosis, 14 Tage nach der 2. Dosis	0.5 - 2.0 (65-90%) 2-10 (95-100 %)		
der Abstand unberück- sichtigt.	3 x 1 ml		0	1 u. 2 Wochen nach der 3. Dosis	1-5 (100 %) 2-40		
0, (Booster)	1 x 1 ml		0	7, 14,	2-5, 2-20 (in Individuen, deren Mittelwerttiter 0,3-05 sind		
0, 3, 7, 14,	4 x 1 ml	S/c		10, 14, 30, 90,	1.0, 3.9, 4.6, (+) 1.8		Shah et al. 1976 (149)
0, 10,	2 x 2 ml	S/c		"	0.6, 3.5, 3.0, 2.0	etwa 30	

Tag der Impfung	Anzahl der Dosen	Impf- modus	Tag der Booster- dosis	Tag der AK-Bestimmung nach der 1. Vakzine- dosis	AK-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW (+)	Literatur
0, 3, 7, 14,	4 x 1 ml	i/m	--	14, 35, 365,	3.2, 2.5, 0.4,	4.6-32 (12.0)	Plotkin et al. 1976 (135)
0, 3, 7, 14,	4 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	4.4, 3.5	1.1-2.9 (1.6)	
0, 3, 7, 14,	4 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	4.3, 7.4,	2.1-7.4 (3.5)	
0, 3, 7, 14,	4 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	8.5, 10.8,	1.5-3.7 (2.2)	
0, 3, 7, 28,	4 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	1.0, 1.8,	1.1-2.9 (1.6)	
0, 3, 21,	3 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	0.6, 0.9,	1.1-2.9 (1.6)	
0, 7, 28,	3 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	2.8, 5.1,	1.5-3.7 (2.2)	
0, 7, 31,	3 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	3.9, 9.6,	1.5-3.7 (2.2)	
0, 7,	2 x 1 ml	i/m	--	14, 35,	2.7, 0.8	1.1-2.9 (1.6)	

Tag der Impfung	Anzahl der Dosen	Impf- modus	Tag der Booster- dosis	Tag der Ak-Bestimmung nach der 1. Vakzine- dosis	Ak-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW	Literatur
0, 28,	3 x 1 ml	s/c	--	7, 28, 56, 248, 455,	0, (12-90), (10- 1000), 30-2000) (2-40)	4.0	Kuwert et al. 1976 (104)
0, 7, 14,	3 x 1 ml	s/c	--	7, 25, 140 - 200,	0, 10-2000, -- (100 %)		
0,	1 x 0,4ml	i/d	--	0, 3, 7, 14, 28	<0.1, <0.1, (+) 0.21, 6.5, 7.0,		Turner et al. 1976 (170)
0, 1, 2,	4 x 0,1ml	i/d	--	"	<0.1, <0.1, <0.1, 9.8, 12.4,		
0, 3, 7,	4 x 0,1ml	i/d	--	"	<0.1, <0.1, <0.1, 5.89, 12.5		
1, 3, 8,	3 x 0,2ml	i/d	28	28, 38, 365, 1,5J 2 J,	2.93, 11, 1.5, (+) 0.6, 0.3,	1.2	Cox und Schneider 1976 (37)
1, 3,	3 x 0,2ml	i/d	28 1.5J	" 558	2,93, 16, 0.6, --, 16,		
1, 28,	2 x 0.2ml	i/d	1J	28, 38, 1J	0.52, 5, 0.15		

Tag der Impfung	Anzahl der Dosen	Impf- modus	Tag der Booster- dosis	Tag der Ak-Bestimmung nach der 1. Vakzine- dosis	Ak-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW	Literatur
0, 1M, 2M	3 x 1 ml	i/m	--	4, 5, 8, 12 Wochen 1 Jahr, 2 Jahre	1.26, 7.82, 11.44 7.87, 1.83, 2.43		Ajjan et al. 1978 (4)
0, 1M 2M	3 x 1 ml	s/c	--	"	1.28, 9.05, 9.09 7.60, 1.47, 1.72		
0, 1M	2 x 0,1ml	i/d, i/d		4, 5, 8 - 12 Wochen	1.94, 7.92, 4.10		
0, 1M	1 x 0.1ml 1 x 1 ml	i/d s/c	--	"	2.95, 13.74, 10.66		
0, 1M	2 x 1 ml	s/c s/c	--	"	2.50, 11.48, 4.83		
0, 7, 14,	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 42	--, 1.7, 1.9, 1.0	1.07	Cabaseo et al. 1978 (30)
0, 7, 14,	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 42	0.02, 1.3, 3.8, 2.3,	2.3	
0, 7, 14,	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 42	0.01, 8.2, 7.5, 5.2,	3.6	
0, 28, 56,	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 42, 56, 70	n.t., 0.03, 0.02, 0.14, 0.08, 0.51	1.07	
0, 28, 56,	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 42, 56 70,	0.04, 0.15, 0.05, 2.6, 0.8, 1.4,	2.30	
0, 28, 56	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 28, 42, 56, 70,	0.02, 0.13, 0.19, 6.3, 3.5, 11.5	3.6	
0, 7, 21	3 x 1 ml	i/m	--	7, 14, 24, 28, 35, 42, 49	0.02, 5.9, 10.1, 16.0, 18.0, 14.8, 11.7,	6.4	

Tag der Impfung	Anzahl der Dosen	Impf- modus	Tag der Booster- dosis	Tag der Ak-Bestimmung nach der 1. Vakzine- dosis	Ak-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW	Literatur
0, 28, 56,	3 x 1 ml	s/c	365	0, 28, 56, 77, 365, 386,	(+) 0, 28, 2.6, 59.10, 75, 37, 16.76, 38.66,		Costy-Berger 1978 (36).
0, 7, 21	3 x 1 ml	i/m	7, 21, 35,		(+) 0.1, 8.3, 20	8.0	Cox, Klie- mann, Schneider, 1978 (38)
0, 7, 14,	3 x 1 ml	i/m	9-14 Tage nach der 2.-4. Injektion		(ca.) 2.0 log ₁₀	(3.378) 1.19 - 5.25	Kuwert et al. 1978(108)
0, 7,	2 x 1 ml	i/m	"		" 1.7 log ₁₀	(5.97) 5.0-7.5	
0, 3, 7, 21	4 x 1 ml	i/m	"		" 2.5 log ₁₀	(3.38) 1.19 - 5.25	
"	"	"	"		≥ 2.5 log ₁₀	(5.97) 5.0-7.5	
"	"	"	"		" 3.0 log ₁₀	13.2	
					> 2.0 log ₁₀ < 2.5 log ₁₀	0.8	

Tag der Impfung	Anzahl der Dosen	Impf- modus	Tag der Booster- dosis	Tag der Ak-Bestimmung nach der 1. Vakzine	Ak-Titer (neutra- lisierende Ak im Serum)	AW	Literatur
0 (Booster)	1 x 1 ml	i/m	0	0, 7, 14,	- 9 fach, 33 fach (+)		Lehmann, Kuwert, Henessen, widmann 1978 (112)
0, 7, 21,	3 x 1 ml	i/m	--	14	1 : 100 - >1 : 1000		
0, 3, 7, 21,	4 x 1 ml	i/m	--	0, 35,	0.086, 15.3,		
0, 28, 56,	3 x 1 ml	i/m	6 Monate 12 Monate 24 Monate (i/d, 0.1/ s/c 1 ml)	1, 2, 3, 6, 12, 24, 3 Monate, 6 Monate	2.7 - 4.5, 5.7-9.2, (+) 5.7-15.3, 2.3-6.6, 0.9-5.5, 1.3-9.5	1.1- 3.9	Nicholson Turner u. Aoki 1978 (129)
0, 28, 56,	3 x 0.1 ml	i/d	"	"	2.2 - 4.6, 5.0-35.9, 11.1 - 45.2, 3.5 - 11.9, 2.3 - 7.9, 1.5 - 8.3		

a. HDCS-Vakzine

b. RIGH

Präinfektionelle Impfung

a. HDCS-Vakzine

b. HDCS-Vakzine

Booster-Impfung

a. Eine Impfung mit 1,0 ml nach einem Jahr.

b. Weitere Impfungen je 1,0 ml im Abstand von 2 - 5 Jahren.

Tabelle 4: Postinfektionelle Studien mit der⁺⁾
HDCS-Vakzine

Nr.	Anzahl geimpfter exponierter Personen	Zellsubstrat/ Firma	Literatur
1	56	Wi 38/Mérieux	Kuwert et al. 1976 (104)
2	45	Wi 38/Mérieux	Bahmanyar et al. 1976 (21)
3	108	Wi 38/Mérieux Wi 38/Behring	Kuwert et al. 1977 (105,106)
4	326	Wi 38/Mérieux MRC 5/Behring	Kuwert et al. 1978 (108)
5	3	Wi 38/Mérieux	Kuwert et al. 1978 (109)
6	126	MRC 5	Klietmann et al. 1978 (92)
7	151	Wi 38/Mérieux	Mean et al. 1978 (123)
8	137	Wi 38/Wyeth	Winkler et al. 1978 (194)
9	41		Dempster et al. 1979 (43)

+) (Befunde des WHO Treffens, Essen, 1980, sind
hier nicht mit einbezogen).

C. Die Passive Immunisierung

I Geschichte und Entwicklung des TWV-HIS der TW-Schutztherapie

Die postexpositionelle aktive Impfung reichte allerdings nicht in jedem Fall aus, den Ausbruch der Krankheit zu verhindern (Greenwood 1945 (59), Mckendrick 1940 (119), Proca und Bobes 1940 (165)). Schon 1880 (Babes und Lepp 1889 (18), Babes und Cerches 1891 (19)) wurde bei Hunden und Kaninchen das Blut von hyperimmunisierten Hunden, welches das "Straßen-Virus" in vitro neutralisierte, als Passivschutz vor der Tollwut verwendet. Es wurde auch über die Wirksamkeit der Passiv-Immunisierung durch die Verwendung von Ziegen- und Kaninchenantisera gegen das "Virus fixe" berichtet (Hoyt et al. 1936, 1938 (77, 78)).

Habel 1945 (61), der auch die passive Immunisierung bei Mäusen, Meerschweinchen und Affen durchgeführt hat, konnte zeigen, daß nach der Infizierung verabreichtes Anti-TW-Serum einen erheblichen größeren Schutz bot, als die Verabreichung der Vakzine allein; der Schutz war noch vollständiger, wenn die Applizierung des Serums mit einer Vakzinierung verknüpft wurde. Reduzierte Mortalität bei Meerschweinchen und Hunden bei der Verwendung von hyperimmunem Serumkonzentrat wurde von Koprowski et al. 1950 (97) und von Koprowski und Black 1954 (98) beobachtet.

So wurde von der WHO 1954 (177) empfohlen, daß "in all human cases of severe exposure one dose of serum followed by vaccine should be used".

Die Wirksamkeit der HIS-Vakzine-Therapie wurde zum ersten Male (Baltazard et al. 1955 (22)) im Iran demonstriert: Zwölf von achtzehn Menschen, die nach Bißverletzungen von einem tollwütigen Wolf sehr schwere Kopfverletzungen aufwiesen, wurden mit HIS und Phenol-inaktivierter Vakzine behandelt (fünf mit zwei Serumdosen und 21 Vakzinedosen; sieben mit einer Serumdosis und 21 Vakzinedosen). Fünf

Patienten wurden nur mit der Vakzine behandelt. Bei einem sechsjährigen Jungen mit zerquetschten Parietal-Knochen und zerrissener Dura mater wurden sechs Serumdosen und 21 Vakzinedosen verabreicht. Während bei der Behandlung mit HIS plus Vakzine nur ein Todesfall beobachtet wurde, gab es bei den nur mit Vakzine behandelten fünf Personen drei Todesfälle. Unter den Überlebenden befand sich der sechsjährige Junge. Habel und Koprowski 1955 (62) beobachteten, daß die bei kombinierter Anwendung von Serum und Vakzine frühzeitig nachweisbaren Ak in der Verhütung der Krankheit wirksamer waren als die Vakzinierung allein. Ähnliche Beobachtungen wurden von Selimov et al. 1959 (144) sowie Sabat und Bahmanyar 1964 (141) gemacht. Zusätzlich zur Parenteralverabreichung hat sich das HIS bei der örtlichen Behandlung von Bißwunden als brauchbar erwiesen (Dean 1963 (40), Dean 1966 (41), Kaplan et al. 1962 (86), Kaplan und Paccaud 1963 (87)). In ihrem "sixth committee Report" hat die WHO 1973 (179) empfohlen, bei jeder Bißverletzung durch ein tollwütiges Tier (insbesondere bei schweren Bißverletzungen) das TW-HIS durch vorsichtiges Eintröpfeln in die Wunde und durch Infiltration rings um die Wunde, zu applizieren.

Ein beim Menschen verwendetes Anti-TW-Serum ist in Pferden (Lepine und Atanasiu 1973 (113)), Maultieren (Mirchsamy 1963 (124)) und Eseln (WHO 1960 (178)) durch Hyperimmunisierung erzeugt worden. Verwendet worden ist hauptsächlich TW-HIS von Pferden - im Iran wird das aus Maultieren gewonnene Antiserum benutzt. Für den menschlichen Gebrauch wurde Antiserum vom Schaf als unbefriedigend betrachtet (WHO 1954 (177)), da es eine ungewöhnliche hohe Inzidenz für die Serumkrankheit aufweist. Auch von einem aus Pferden gewonnenen Anti-TW-Immunoglobulin (Ig) für den menschlichen Gebrauch wurde berichtet (Selimov und Gradienko 1973 (147)).

Auch bei Durchführung der empfohlenen postexpositionellen Behandlung sind vereinzelte Versager bei kombinierter HIS/Vakzine-Therapie aufgetreten (Anderson et al. 1966 (5),

Dehner 1970 (42), Sabeti und Bahmanyar 1964 (141), Baltazard und Bahmanyar 1955 (22), Hattwick 1972 (67)). Tierversuche haben gezeigt, daß mit zunehmendem Zeitabstand zwischen Exposition und Behandlung sich der Erfolg der HIS/Vakzine-Behandlung vermindert und, daß wie bei den meisten Tierversuchen nach 72 Stunden kein Schutz mehr besteht (Habel 1945 (61), Hildreth 1963 (74 a)). Bei der Mehrzahl der Impfersager wurde die Behandlung innerhalb von 24 Stunden begonnen. Andere Faktoren wie Vakzinepotenz und die Fähigkeit eines Individuums Ak zu bilden, spielen offensichtlich eine Rolle für die Wirksamkeit der Behandlung (Habel und Koprowski 1955 (62)). Bei einem Sero-Impfersager wurde (Hattwick 1972 (67)) eine supprimierte Immunantwort gegenüber der EEV angenommen.

II. Probleme bei der kombinierten HIS/Vakzine-Therapie

a. Serumkrankheit

Wie von der Anwendung heterologen Serums bekannt ist, ist die Verabreichung von Pferd- oder Maultier-Anti-TW-Serum oft von einer Serumkrankheit (Unverträglichkeitsreaktion) begleitet. Hosty und Hunter 1953 (75) berichteten, daß 5 - 8 Tage nach der Verabreichung des Pferde-Anti-TW-Serums eine variable Zahl von Serumkrankheitsfällen erwartet werden kann. Karliner und Beluval 1965 (90) beobachteten, daß bei Individuen, die lediglich Pferde-Anti-TW-Serum erhalten hatten, 16,3 % unter Unverträglichkeitsreaktionen litten, wobei sich eine Häufigkeit von 46,3 % bei Patienten über 15 Jahre ergab. Hildreth 1966 (74) berichtete über eine Serumkrankheits-Häufigkeit von 34 % bei einer Gesamtzahl von 52 Individuen, die Pferde-Anti-TW-Serum erhalten hatten. Bei Empfängern des Pferde- oder Ziegen-Anti-TW-Serums wies Hattwick (1974 (68 a)) eine Häufigkeit von 12 - 46 % der Serumkrankheit nach.

b. Immunsuppression

Atanasiu et al. 1956 (11) stellten die Frage nach der Interferenz des passiv verabreichten Ak mit der immunogenen Aktivität der Vakzine, nachdem sie beobachtet hatten, daß eine Tendenz zur Bildung niedrigerer Ak-Niveaus am 21. und 28 Tag nach Beginn der Serovakzination bei der mit HIS plus Vakzine behandelten Gruppe im Gegensatz zu der lediglich mit Vakzine behandelten Gruppe vorhanden war. Ein ähnlicher Effekt wurde von Habel 1957 (63) und Veragahvaen 1957 (174) bei Mäusen und Meerschweinchen und von Fox et al. 1957 (55) und Habel 1957 (63) beim Menschen quantitativ demonstriert, wobei die Hemmung der vakzineinduzierten Ak-Bildung parallel mit einer Verminderung der Resistenz zum "Virus challenge" in Mäusen verläuft; durch die Verabreichung von Boosterdosen der Vakzine nach dem 10. Tag der Behandlung konnte die Hemmung überwunden werden. Die praktische Bedeutung dieser Beobachtung ist, daß trotz der empfohlenen Therapie die TW-Erkrankung noch auftreten kann und somit das passiv verabreichte HIS nicht wirksam war. In einer Serie von klinischen Versuchen haben Atanasiu et al. 1957, 1961, 1967 (12, 13, 14) die Wirkung der Anti-TW Serovakzination quantitativ untersucht. Sie bestätigten den Effekt der Interferenz des passiv zugeführten Anti-TW-HIS auf die immunogene Aktivität des Impfstoffes, sowie die Fähigkeit des HIS, mit der Booster-Antwort zu interferieren. Sie beobachteten außerdem, daß durch die Verabreichung von Vakzine-Boosterdosen (10 und 20 Tage nach der letzten Impfung) dieses Interferenzphänomen vermieden werden konnte. Eine 24-stündige Verzögerung zwischen der Verabreichung der ersten Vakzinedosis und der Applizierung des HIS verminderte den inhibierenden Effekt (Fox et al. 1957 (55)).

Auch von anderen Arbeitsgruppen, die sich mit der Immunologie der nicht-viralen Antigene befassten, ist die Immunsuppression von passiv applizierten spezifischen Ak gezeigt

worden (Rowley und Fitch 1964 (139), Uhr und Baum 1961 (171)). Uhr und Finkelstein (1963 (172 a)) meinten, daß diesem Effekt ein "Feedback"-Mechanismus zugrunde liegt. Später wiesen sie darauf hin, daß der immunsuppressive Effekt (Uhr und Finkelstein 1967 (172)), der durch die Wechselwirkung mit Antigen entsteht, am Makrophagen ansetzt. Möller und Wigzell 1965 (125) schlugen vor, daß die Ak auf der zellulären Ebene die Immunantwort inhibieren, und zwar durch Entfernung des auf die Proliferation der Ak-produzierenden Zellen wirkenden Stimulanz und nicht durch direkter Beeinflußung des Ak-Synthese-Regulationssystems ("committed cells"). Es wurde ferner festgestellt (Finkelstein und Uhr 1964 (52), Möller und Wigzell 1965 (125), daß bei der Suppression der aktiven Immunantwort, die 7S Ak leistungsfähiger sind als die 19S Ak. Henry und Jerne 1968 (72) postulierten eine spätere Theorie, wonach die durch die aktive Immunisierung induzierten Ak von den 19S Ak eher stimuliert als inhibiert werden.

Der immunsuppressive Effekt der passiv zugeführten Anti-TW-Ak auf die aktiv induzierte Immunantwort der TW-Vakzine ist beim Menschen (mit Gehirngewebe-, Vogelgewebe- und Zellkulturvakzinen: (11, 12, 13, 14, 68, 144, 55, 44, 34, 35, 20) und bei Versuchstieren (63, 174, 9, 44, 99, 188) mit heterologen Anti-TW-Seren (193, 9, 63, 174, 20) und homologen Ak (193, 9, 188, 69) beobachtet worden.

Archer und Dierkes 1968 (9) beobachteten eine stärkere Hemmung beim homologen als beim heterologen Serum. Dies wurde von Winkler et al. 1969 (193) nicht beobachtet. Im Gegensatz zu Finkelstein und Uhr 1964 (52) sowie Möller und Wigzell 1965 (125), konnten Wiktor et al. 1975 (188) keinen Unterschied zwischen den inhibierenden Kapazitäten der 7S - und der 19S-homologen Anti-TW-Ak feststellen. Weiter stellten Wiktor et al. 1971 (188) fest, daß dieser hemmende Effekt zum Teil überwunden werden kann, wenn die Zahl der Vakzinedosen erhöht wird. Veeraghavan et al. 1957 (174) beobachteten, daß heterologes Antiserum in gewissen

Konzentrationen bei Meerschweinchen mit dem von der TW-Vakzine verliehenem Schutz interferiert; bei optimalem Verhältnis Dosierung des Anti-Tw-Serums/Vakzine werden jedoch bessere Ergebnisse erzielt. Daß die Suppression der aktiven Ak-Bildung von den passiv zugeführten Ak durch die Antigendosis beeinflußt wurde, beobachteten auch Uhr und Baumann 1961 (171). Es scheint, wie von Kuwert et al. 1978 (108) vorgeschlagen, daß die Interferenz der passiven Ak (TW-HIS-Zuführung) mit der aktiven Ak-Bildung das Resultat eines Mißverhältnisses zwischen Antigen und Ak in vivo darstellt - mit Maskierung des Antigens und Blockierung der Immunantwort. Bahmanyar 1974 (20) konnte in einer Studie einen derartigen immunsuppressiven Effekt beobachten: Kuwert et al. 1978 (109) dagegen nicht. Beide Arbeitsgruppen verwendeten eine potente Gewebekultur-Vakzine.

Zwecks Überwindung der Immunsuppression empfahl die Weltgesundheitsorganisation (WHO 1960 (178)) Boosterdosen 10 und 20 Tage nach der letzten Vakzinedosis zu verabreichen und lediglich (WHO 1978 (182)) Vakzinen über eine gewisse Potenz in der postexpositionellen Therapie zu verwenden.

III Entwicklung des TW-Ig humaner Provenienz

Mangels einer hoch immunogenen, von Nebenwirkungen freien und vollständig sicheren Vakzine für die Anwendung beim Menschen, wurde die Herstellung eines homologen Anti-TW-Serums lange verhindert. Der erste Versuch zur Herstellung des homologen Ig wurde von Hosty et al. 1959 (76) durch die Immunisierung freiwilliger Erwachsenen mit der EEV gemacht. Dieses Ig wies einen neutralisierenden Ak-Titer auf, der weniger als ein Zehntel des Titers des Pferdeantiserums betrug und produzierte darüberhinaus bei erwachsenen Freiwilligen viel niedrigere Ak-Titer als das Pferdeantiserum. Die homologen Ak wurden dabei langsamer abgebaut als die heterologen. Anderson und Sgouris 1966 (6) hatten auch Chargen von Ig früher geimpfter Tierärzten hergestellt,

auch diese Chargen wiesen ebenfalls niedrigere Titer auf als die bei Verwendung der Pferdeantisera erhaltenen. In ähnlicher Weise hatten Winkler et al. 1969 (193) und Sikes et al. 1969 (153) von früher geimpften Tierärzten, die Boosterinjektionen bekommen hatten, Chargen von RIGH hergestellt. Obwohl die Ak-Niveaus dieser Chargen niedriger lagen als die des Pferdeantisera, erzeugten sie bei Mäusen, Meerschweinchen und Hunden einen vergleichbaren Schutzeffekt. Cabasso et al. 1971 (26) stellten mehrere RIGH-Chargen aus Plasma her. Gewonnen wurde das Plasma entweder von klinisch gesunden, erwachsenen Freiwilligen, die wegen einer aktuellen oder früheren Exposition mit TW-erkrankten oder TW-verdächtigen Tieren eine oder mehrere Impfserien von TW-Impfstoff bekommen hatten (Semple-Vakzine, EEV oder CEV) oder von solchen Personen, die aufgrund ihres Berufes die präexpositionellen Immunisierung gegen TW durchgemacht und auch periodische Auffrischungsimpfungen erhalten hatten. Die voraussichtlichen Spender wurden zuerst auf neutralisierende Ak gegen das TWV getestet und lediglich diejenigen ausgewählt, bei denen ausreichende Ak-Titer vorhanden waren, um einen Plasmapool mit akzeptablem Durchschnittstitern zu erhalten. Vor dem "Poolen" und anschließend IgG-Fraktionierung wurden in den Plasmaeinheiten die neutralisierenden Ak-Titer bestimmt. Die Potenzen dieser Chargen lagen über den Potenzen der Pferdeantisera. Dieses RIGH wurde 1974 in den USA zur allgemeinen Anwendung freigegeben (Cabasso et al. 1974 (27)).

Um zu garantieren, daß im Endprodukt Ig eine ausreichende Potenz vorhanden ist, muß beim Ausgangsmaterial, dem Plasmapool, eine Konzentration von 8 - 10 "International Units/ml (IU/ml)" (Sikes 1973 (155) oder 6 - 8 IU/ml (Cabasso et al. 1971 (26) neutralisierender Ak vorhanden sein. Ein solcher Pool wäre dann nur durch gezielte Hyperimmunisierung von Versuchspersonen möglich. Einschränkende Faktoren sind nach Cabasso 1974 (27 a) Die Verfügbarkeit einer potenten Vakzine. b) die Notwendigkeit "good res-

ponders" zu identifizieren weil die Ak-Antwort, unabhängig von der Vakzinepotenz, auch von Spender zu Spender erheblich variieren kann.

c) Auch bei "good responders" fallen TW-Ak-Titer rapide ab, oft bis unter das gewünschte Niveau, so daß Boosterdosen erforderlich sind.

IV Vorteile des TW-Ig humaner Provenienz

Das homologe Serum schließt das Risiko der Serumkrankheit aus. In klinischen Versuchen von Rubin et al. 1973 (140) und Hattwick et al. 1976 (69) wurde gezeigt, daß es keine ungünstigen Nebenwirkungen besitzt.

Bei therapeutischer Anwendung halten die homologen Ak ein höheres Niveau für längere Zeit und zeigen besseren Schutz (Smolens 1961 (158), Archer und Dierks 1968 (9)) beobachteten, daß ein Tag nach der Verabreichung der gleichen Menge von homologen und heterologen TW-Seren ähnliche Titer neutralisierende Ak erzeugt wurden und die Ak-Titer der homologen Seren viel langsamer abnahmen als die der heterologen.

Das homologe Tollwutserum schien wirksamer als das heterologe in der "post-challenge" Behandlung an Hunden (Winkler 1969 (193)). Die passiv erworbene Immunität konnte am ersten Tag nach der Verabreichung von homologen Serum nachgewiesen werden (Wiktor et al. 1971 (188)). In vergleichenden Wirksamkeits-Testen an Versuchstieren stellte sich heraus, daß RIGH genau so wirksam wie Pferdeantisera war (Winkler et al. 1969 (193)).

In klinischen Versuchen wurde demonstriert (Cabasso et al. 1971 (26), Loofbourow et al. 1971 (115)), daß bereits 24 Stunden nach der Verabreichung von 40 RIGH IE/kg Körpergewicht sowie 20 RIGH IE/kg Körpergewicht (die Hälfte der empfohlenen Pferde-Serumdosis) nachweisbare Ak-Niveaus in allen Versuchspersonen vorhanden waren, und die Abbauraten

des RIGH stimmte mit der (des normalen menschlichen Ig) bei der homologen passiven Immunisierung beim Menschen überein; die Halbwertszeit der RIGH war doppelt so lang wie des Pferdeantiserums. Rubin et al. 1973 (140) zeigten, daß die Halbwertszeit bei den IgG-Ak (in diesem Fall neutralisierende-Ak) ungefähr bei drei Wochen liegt.

V Righ und das Interferenzphänomen

Vorher (siehe II b) wurde erwähnt, daß beide Antiseren, sowohl das homologe als auch das heterologe, bei passiver Zuführung die aktive TW-Vakzine-induzierte Ak-Antwort inhibieren können. Hinsichtlich des RIGH erhebt sich die Frage, ob die längere Verweildauer der homologen Ak im Kreislauf eine noch ausgeprägtere Interferenz als die des Pferdeantiserums zur Folge hat. Aus den Versuchen Uhr und Baumann 1961 (171) geht hervor, daß hauptsächlich die Intensität des Antigenreizes die Interferenz des passiven Ak auf die Aktiv-Immunantwort beeinflusst. Das gleiche wird bei der Arbeit von Archer und Dierks 1968 (9) gesehen, wobei das homologe Serum mit der Aktiv-Ak-Antwort der potenteren SMGV interferiert. Auch Winkler et al. 1969 (193) haben gezeigt, daß kleinere Dosen von homologen Ak keine Interferenz mit der aktiven Immunantwort bei Hunden verursachten. Obwohl eine einzelne Dosis des homologen Serums die durch eine sehr potente TW-Vakzine erzeugte Immunantwort vollständig blockiert, war dieser inhibierende Effekt zum Teil aufhebbar, wenn die Anzahl der Vakzinedosen erhöht wurde, wie Wiktor 1971 (188) zeigen konnte.

Klinische Versuche beim Menschen mit EEV und RIGH wiesen darauf hin, daß eine Dosis von 40 IE/kg Körpergewicht (von der WHO empfohlenen Pferdeantiserum-Dosis) mit der vom Impfstoff induzierten optimalen Ak-Bildung interferieren kann, während die Interferenz minimal oder über-

haupt nicht vorhanden war, wenn 20 IU/kg Körpergewicht verabreicht wurden (Cabasso et al. 1971 (26), Loufbourow et al. 1971 (115)). Hattwick et al. 1974 (68) haben beobachtet, daß bei einer Kombination von RIGH mit 23 statt 16 Dosen EEV keine signifikante Immunsuppression mehr vorhanden war. Bezüglich der Kombination von RIGH mit der HDCS-Vakzine (die in ihrer Immunogenität der EEV überlegen war) demonstrierten Kuwert et al. 1978 (109) in einer Pilot-Studie an 19 erwachsenen freiwilligen Personen durch die Verwendung von 20 IE RIGH/kg Körpergewicht, kombiniert mit der HDCS-Impfung (Essener Schema: Tag 0, 3, 7, 14, 30, 90), das Nichtvorhandenseins des Interferenzphänomens. So könnten die Beobachtungen der Bahmanyar Studie 1974 (20), in der durch eine Kombination von 50 IE Maultierserum/kg Körpergewicht mit der HDCS-Vakzine eine Immunsuppression der aktiven Ak-Antwort entstand, als Folge eines Überschusses von HIS erklärt werden. Nachträglich wurden ähnliche Beobachtungen wie von Kuwert et al. 1978 (109) bei Verwendung der HDCS-Vakzine mit 20 IE RIGH/kg Körpergewicht von Nicholson und Turner 1978 (130), Hafkin et al. 1978 (65) sowie Steck et al. 1978 (161) gemacht.

D. Materialien und Methoden

a. Material

I Virusstämme

- a. Tollwut "Challenge Virus Standard"(CVS 11) adaptiert an die BHK 21 C 13 S Zelllinie, wurde freundlicherweise von Professor P. Atanasiu, Pasteur Institut, Paris, zur Verfügung gestellt
- b. Tollwut "Challenge Virus Standard" (CVS 11), adaptiert an Mäusegehirn, stand im Institut zur Verfügung.
- c. Tollwut Virus Stamm "Flury Low Egg Passage", in Hühner-embryofibroblasten vermehrt, konzentriert und hoch gereinigt, durch "Continuous Flow Centrifugation", wurde freundlicherweise von den Behringwerken zur Verfügung gestellt. Dieses Antigen wurde in den KBR eingesetzt.

II Zelllinie

- a. BHK 21 C 13 S (Macpherson und Stoker 1962 (120)) wurde in der 23sten Passage von Professor P. Atanasiu, Institut Pasteur, Paris und BHK 21 (120) in der 42sten Passage von Dr. T. J. Wiktor, Wistar Institut, USA, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

III Versuchstiere

Männliche Swiss Albino Mäuse, NBRI Stamm (14 - 16 g schwer), wurden von der Fa. Willi Gassner, Tieranzucht Anstalt Hannover, gekauft.

- IV Schafserthrozyten wurden als 50 %-ige Suspension von der Fa. Oxoid bezogen.

V Komplement

Komplement wurde aus gesunden Meerschweinchen durch Ausblutung und anschließender Serumgewinnung bei 0°C

hergestellt und sofort bei -70°C eingefroren und aufbewahrt.

VI Vakzinen

BPL-inaktivierte HDCS-Vakzine wurde vom Institut Mérieux, Lyon, Frankreich, bezogen. Zwei Chargen des Impfstoffes wurden im Versuch eingesetzt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Antigenwert zweier HDCS-Vakzinen bei 4°C und 37°C gegenüber zwei Standards

Vakzine (HDCS Wi 38)	Standard	Antigenwert	
		4°C	37°C
M0889	NIH 180	2,56	1,4
	WHO	5,12	2,8
M1002	NIH 182	4,52	3,1
	WHO	9,04	6,2

(Persönliche Mitteilung, Herr Dr. C. Charbonnier, Institut Mérieux, Lyon, Frankreich).

VII Seren

a. Tierseren

TW-HIS, in Meerschweinchen hergestellt, wurde als positive Kontrolle in der KBR mitgeführt.

b. Humanseren

1. Negative Kontrollseren wurden von drei gegen TW nicht geimpften Personen gewonnen und bei -20°C aufbewahrt.

2. Positive Kontrollseren

TW-Ig (Hyperab^r) wurde von Cutter Laboratories erhalten. Das TW-Ig enthielt 150 Internationale Antikörper Einheiten/ml. HIS wurde von einem mit HDCS-

geimpften Probanden gewonnen.

Das Internationale Referenz Serum (WHO Standard) enthielt 80 IE/ml und wurde vom Statens Serum Institut, Kopenhagen, zur Verfügung gestellt.

3. Probandenseren

85 gesunde Personen wurden mit HDGS Vakzine geimpft. Von diesen 85 Impfungen waren 78 Plasmaspender (die routinemäßig klinisch untersucht wurden) und 7 Kontrollpersonen (keine Spender). Weil die Impfung mit zwei verschiedenen Vakzinechargen durchgeführt wurde, wurden die Impfungen in zwei Gruppen (A und B) geteilt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6 Schema der Impfung

Gruppe	Vakzine- chargen	Zahl der Impflinge	Bisherige TW- Impfung	Volumen der Dosen	Zahl der Dosen	n	n1	Besondere Bemer- kungen
A	M 0889	47	keine	1 ml	4	41	6	4 Dosen mit M 0889
B	M 0889 M 1002	38	keine	1 ml	4	37	1	1. Dosis mit M 0889 2., 3., 4. mit M 1002

n = Anzahl der Plasmaspender

n1 = Anzahl der Kontrollpersonen

Einzelne Dosen des Impfstoffes (1 ml) wurden fortlaufend am Tag 0, (erster Tag der Impfung), Tag 7, Tag 14 und Tag 35 intramuskulär (m. deltoideus) verabreicht. Am Tag 0 wurde eine prävakzinale Serumprobe entnommen, während die postvakzinalen Serumproben am Tag 7, 14, 35, 42 und 49 entnommen wurden. Die Seren wurden bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Zwischen den Testen wurden die aufgetauten Seren bei 4°C aufbewahrt. Alle Plasmaspender wurden zwischen Tag 0 und Tag 49 plasmapheriert. Die Zahl der Spenden variierte von ein bis 9 mal, ebenso variierte auch der Abstand zwischen den Plasmapheresen (siehe Anhang 1).

Die Plasmaspender wurden der "Doppel Plasmapherese" unterzogen (2 Einheiten Vollblut wurden jedes Mal entnommen) und ca. 600 ml Plasma abzentrifugiert.

Die Erythrozyten wurden in den jeweiligen Spender retransfundiert.

Bei der Kontrollgruppe A waren Serenproben am Tag 7 von 6 Impflingen, und am Tag 14 und Tag 35 von 2 dieser 6 erhältlich. Zur weiteren Blutentnahme stellten sich Impflinge dieser Gruppe nicht zur Verfügung. Ein Impfling der Kontrollgruppe B nahm nur bis zum Tag 35 an der Blutentnahme teil.

VIII Pufferlösungen, Nährmedien, sonstige Lösungen

- a. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) ohne Ca^{++} und Mg^{++} , pH 7,3 (nach Dulbecco und Vogt 1954 (46)).
- b. 0,75 % Rinderserumalbumin (BSA) enthaltende PBS.
- c. Veronalpuffer pH 7,2 (nach Kabat und Mayer 1971 (85)).
Kurz vor dem Gebrauch wurde die Stammlösung durch Hinzufügung von 4 Teilen deionisiertem Wasser zu einem Teil der Stammlösung verdünnt.
- d. Transformationslösung:

Natriumbicarbonat	1,0 g
Kaliumzyanid	0,5 g
Kaliumferrizyanid	0,2 g

Deionisiertes Wasser bis auf 1000 ml aufgefüllt.

e. Zellwachstumsmedium (nach Mcpherson und Stoker 1962 (120)).

1. Minimum Essential Medium (Glasgow-Modifikation, MEMG).
2. Tryptose-Phosphat, 2,95 %-ige Lösung.
3. Glutamin 200 mM 10-fach konzentrierte Lösung, bei -20°C aufbewahrt.
4. Natriumbicarbonat (5,5 %-ige Lösung)
5. Fötale Kälberserum bei -20°C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wurde es bei 56°C inaktiviert, danach bei 4°C aufbewahrt.
5. Antibiotika: Penizillin und Streptomycin.

"Minimum Essential Medium" wurde mit den oben erwähnten Bestandteilen in den folgende Verhältnisse pro 100 ml Lösung ergänzt.

10 % Fötale-Kälberserum

10 % Tryptose-Phosphat

4,5 % Natriumbicarbonat

1,0 % Glutamin

Zugegeben wurden 100 IE/ml Penizillin und 100 γ /ml Streptomycin.

f. Zellerhaltungsmedium bestand aus "Minimum Essential Medium", das mit den oben erwähnten Bestandteilen in demselben Verhältnis wie beim Zellwachstumsmedium ergänzt wurde mit der Ausnahme, daß das fötale Kälberserum lediglich eine Konzentration von 2 % aufwies.

g. Viruswachstumsmedium enthielt alle Bestandteile in denselben Proportionen wie beim Zellwachstumsmedium mit der Ausnahme, daß das fötale Kälberserum durch 0,3 % BSA ersetzt wurde.

h. Stammlösung von DEAE-Dextran 0,5 g/Liter

i. Trypsin-Versen Lösung: 0,25 % Trypsin und 0,02 % Versen wurden in einem Verhältnis von 1 : 4 zusammengesetzt.

j. Trypanblau (2 %-ige Stammlösung).

k. Einbettungsmedium (nach Rodriguez und Deinhardt 1960 (138)).

b. Methoden

1. KBR (nach Kuwert 1973 (102))

Veronalpuffer - Gebrauchslösung wurde als Verdünnungsmittel für das Antigen (Ag), die Seren und das Komplement verwendet.

Das Ag, welches bei -70° C gelagert war, wurde nach Auftauen in 0,1 % BSA enthaltendem Veronalpuffer verdünnt, um 2 AgCH50 Einheiten (optimale Verdünnung) zu erhalten.

Das Komplement wurde verdünnt um 3CH50 Einheiten zu erhalten.

0,05 ml 1 : 8 vorverdünnte Seren wurden nach der Inaktivierung (56° C im Wasserbad, 30 Minuten) in Mikrotiterplatten (Cooke system) durch die fortlaufende Versetzung von 0,025 ml in Löcher, die 0,025 ml Diluent enthielten, geometrisch verdünnt. Die Übertragung erfolgte durch ein Verdünnungsgerät (Cooke Engineering type).

Die Pipettierung des Puffers in die Platten wurde mit einem "Channelautomatikpipetter" durchgeführt. Die Platten wurden nach der Zugabe von 0,025 ml Volumina des Ag und Komplements bei 4° C über Nacht inkubiert (Kältefixierung). Jede Testreihe wurde parallel mit einer Kontrollreihe, die Verdünnungsmedium statt Ag enthielt, angesetzt. Nach der Inkubation wurden 0,05 ml des Hämolytischen-Systems (HS) zugefügt und die Platten 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

a. Bestimmung der optimalen TWV-Konzentration

Das Ag wurde gegen das Meerschweinchen-HIS im Schachbrettmuster titriert. Verwendet wurde die Makromethode. Die Reaktion erfolgte in Röhrchen. Eine geometrische Verdünnungsreihe, von 1 : 8 bis zu 1 : 2048 wurde sowohl für das Ag als auch für das Meerschweinchen-HIS angesetzt. Meerschweinchen-Komplement wurde verdünnt, damit es 3 CFU enthielt. 0,2 ml jeder Serumverdünnungsstufe wurden gegen das gleiche Volumen der Ag-verdünnung getestet. Nach Hinzufügen von 0,2 ml Komplement wurde 18 Stunden bei 4° C inkubiert. Kontrollen wurden mitgeführt. Das Hinzufügen von 0,4 ml HS erfolgte entsprechend der Zeitversetzung bei der Kältefixierung. Die Röhrchen wurden für "Komplement-Bindung" (d. h. keine Hämolyse) abgelesen. Die höchste Verdünnungsstufe, in der keine Hämolyse erfolgte, sollte 1 AgCH 50 enthalten. Im Test wurde eine Ag-Verdünnung, die 2 AgCH50 enthielt, als optimale Konzentration eingesetzt.

II. MNT (nach Atanasiu 1973 (15))

Das Verdünnungsmedium für Virus und Serum war PBS, das 0,75 % BSA enthielt.

Die Seren wurden 30 Minuten bei 56° C inaktiviert.

Alle Test- und Kontrollseren wurden beginnend mit einer 1 : 5 Verdünnung log 5 Schritten verdünnt.

Die Verdünnungen wurden einen Tag vor dem Test eingesetzt und bei 4° C aufbewahrt. Negatives Kontrollserum wurde nur 1 : 5 verdünnt.

Das Virus(CVS 11 (Mäusegehirn)), das in einer 20 % (w/v) -igen Suspension bei 70° C aufbewahrt worden war, wurde sehr schnell aufgetaut, anschließend bis auf 10 % verdünnt und 10 Minuten unter Kühlung bei 900 g zentrifugiert. Die Serum/Virus Neutralisation wurde in Röhrchen durchgeführt; es wurden die gleichen Volumen (0,5 ml) jeder Serumverdünnung und der optimalen Virusverdünnungsstufe zusammengegeben und 90 Mi-

nuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.

a. Rücktitration der "Challenge dose"

0,5 ml der Virusverdünnungsstufe wurden mit dem gleichen Volumen negativem Kontrollserum versetzt und in 3 $\log_{10}$ Schritten weiter verdünnt. Diese Verdünnungsreihe des Virus wurde gleichzeitig mit der übrigen Serum/Virus-Mischungen 90 Minuten bei 37°C inkubiert.

b. Mausinokulation

Nach der Inkubation wurden alle Röhrchen mit den Serum/Virus-Mischungen in ein Eisbad gestellt. Je fünf Mäuse wurden mit 0,03 ml je Maus je Verdünnungsstufe intrazerebral geimpft. Danach wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet.

c. Beurteilung der Ergebnisse

Alle Todesfälle, die innerhalb der ersten 4 Tage nach der Inokulation erfolgten, wurden als zufällige Todesfälle betrachtet, ebenso wie alle Mäuse, die während dieser 4 Tage gefressen worden waren. Alle Todesfälle, die zwischen dem 6. Tag und dem 14. Tag erfolgten, sowie die Mäuse, die, nachdem sich Krankheitssymptome entwickelt hatten, gefressen wurden, galten als Todesfälle in Folge der Virusinfektion.

Bei der Titration des "Challenge-Virus" wurden die Tiere, die entweder starben oder gelähmt waren, als "positiv" bezeichnet.

Bei den Titrationen der Testseren und Referenzseren wurden die Tiere die überlebten, als "positiv" bezeichnet.

d. Berechnung der Virus- und Ak-Titer

Die Berechnung erfolgte nach der Kärber Formel (Grist 1974 (60)).

1. Virustitration

$$\text{Log MLD50} = L - d (S - 0,5)$$

MLD50 = minimale letalen Dosis

L = negativer Logarithmus der niedrigsten Verdünnungsstufe

d = Differenzen zwischen den Logarithmen der einzelnen Verdünnungsstufen

S = Summe der Anteile "positiv" bei jeder Verdünnungsstufe

$$\text{positiv} = \frac{\text{Anzahl der Mäuse gelähmt und tot}}{\text{Gesamtzahl der geimpften Mäuse}}$$

2. Ak-Titration

In der Kärberformel wird hierbei MLD durch SN ersetzt. Es wird dann der Log des 50 % Wertes des Titters der Serum-Neutralisierenden Ak (SN) errechnet. Der SN Ak-Titer ist die Reziprok-Verdünnungsstufe des Serum, die 50 % der Mäuse gegen die Testdosis (100MLD 50) des Virus schützt.

$$\text{Anteil "positiv"} = \frac{\text{Anzahl der Überlebenden Mäuse}}{\text{Gesamtzahl der geimpften Mäuse}}$$

e. Berechnung der "Challenge dose" zur Anwendung im Test.

Alle Berechnungen werden durchgeführt, um eine Konzentration von 100MLD50 in der endgültigen Serum/Virus-Mischung zu erzielen. Daher wurde die Ausgangsverdünnungsstufe der Gebrauchsvirussuspension verdünnt, um 200 MLD50 zu erhalten. Die optimale Verdünnungsstufe des Virus, die 200MLD50 enthält, wurde durch die abziehen des Logarithmus 200 von dem Logarithmus des

Durchschnittstiters des Virus (erhalten mehrfache Vortitrationen des Virus in Vorversuchen).

III. RFFIT (nach Smith et al. 1973 (156))

DIE BHK 21 wurde als Monolayer (nach Macpherson und Stoker 1962 (120) kultiviert. Die Monolayer sind in ca. 3 - 4 täglichen Abständen regelmäßig umgesetzt worden. Der Test wurde in "Lab-Tek-Chamber-slides" (Miles Co. USA) durchgeführt. Jeder Obejktträger bestand aus 8 Kammern und einem Deckel (Abb. 1 a).

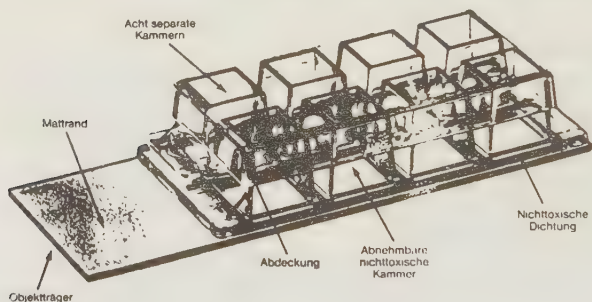


Abbildung 1a: Lab-Tek-Chamber-slide

Testseren, welche für den MNT inaktiviert worden waren, wurden mit Zellwachstumsmedium verdünnt und beginnend mit einer 1 : 2,5 Verdünnung in log 5-Schritten bis 1 : 1562,5 in Eppendorfreaktionsgefäßen weiter verdünnt.

RIGH und HIS (im MNT getestet) wurden beginnend mit einer 1 : 12,5 Verdünnung in log 5-Schritten bis 1 : 7812,5 weiter verdünnt.

Das Normalserum wurde 1 : 5 verdünnt. Bis zum Gebrauch wurden alle Verdünnungen bei 4°C aufbewahrt.

Für das Virus wurde das gleiche Verdünnungsmedium benutzt wie für das Serum. Die benötigte Zahl von Ampullen des Gebrauchsvirus (bei 70°C aufbewahrt) wurden kurz vor dem Gebrauch sehr schnell aufgetaut und wurden verdünnt, um 5,5 FFD 50/0,1 ml (Louie et al. 1975 (117)) zu erhalten. Zwei in log 10-Schritten (Ausgangsverdünnung : optimale Virusverdünnungsstufe) erhaltene Virusverdünnung wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen durch Verdünnung mit 1 : 5 verdünnten Normalserum enthalten.

a. Serum/Virus-Reaktion

0,1 ml jeder Serumverdünnung wurden, beginnend mit der höchsten Verdünnung, in eine Kammer des Lab-Tek-Objektträgers gegeben. 0,1 ml der "optimalen Virusverdünnung" wurden hinzugefügt und vorsichtig durchmischt. Serumkontrolle (0,1 ml der niedrigsten Serumverdünnung) und Zellkontrolle (0,2 ml Verdünnungsmedium) wurden ebenso behandelt.

Rücktitration des Virus

Es wurden 0,1 ml von jeder Verdünnungsstufe des Virus in die entsprechende Kammer pipettiert. 0,1 ml normales (1 : 5 verdünntes) Serum wurde zu jeder Kammer hinzugefügt und durchmischt. Bei jedem Versuch der Rücktitration

wurde ein Duplikat angesetzt, wobei die zweite Titration nach der Übertragung der Hälfte der Serumprobe erfolgte.

Alle Testseren/- und Referenzseren/-Virusmischungen und Viruskontrollen (Rücktitration) wurden 90 Minuten bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert.

b. Zugabe der Zellsuspension zur Serum/Virus-Mischung der Lab-Tek-Kammern

3 - 4 Tage alte: geschlossenen Monolayer von BHK 21 Zellkulturen wurden nach einmaliger Spülung mit PBS trypsinisiert ((1 ml Trypsin-Versen-Gemisch auf einer Zellschicht von 75 cm²) anschließend in frischem Wachstumsmedium zweimal gewaschen (Zentrifugation, 1000 U/min., 5 Minuten) und die Zellen in genügend Medium resuspendiert, um eine Zelldichte von 650.000 Zellen/ml zu erhalten. Zur Feststellung der Zellzahl dient die Vital-Färbung mit Trypanblau mit Hilfe der Neubauer-Kammer (Hallmann 1960 (66a)).

Kurz vor dem Gebrauch wurde die Zellsuspension mit 10 µg/ml DEAE-Dextran behandelt. Nach 90 Minuten Inkubationszeit bei 36°C wurden die Serum/Virus-Mischungen aus dem Brutschrank entnommen, und 0,2 ml der vorgefertigten Zellsuspension in jede Kammer gegeben. Die Kammern wurden sanft hin und her gekippt, danach wurden die Zellkulturen 24 Stunden in 4 - 5 % CO₂ bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Während der Zugabe der Zellen wurde die Zellsuspension unter langsamer ständiger Rührung eines Magnetrührstabs gehalten. In Vorversuchen war beobachtet, daß eine Zelldichte von 500000 Zellen/ml eine geschlossene Monolayerkultur in 24 Stunden ergab. Jedoch mußte eine höhere Konzentration von Zellen im Versuch verwendet werden, um geschlossene Monolayer in 24 Stunden zu erzielen (mög-

licherweise um die Zerstörung von Zellen, die bei der Verwendung eines Magnetrührers verursacht wurde, zu kompensieren).

c. Fixieren der Präparate

Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Kammern aus dem Brutschrank genommen, der Überstand entfernt und die Kammern vom Objektträger abgezogen. Die Objektträger wurden zweimal in PBS gewaschen, eine Minute bei Raumtemperatur und danach 10 Minuten bei -20°C in Azeton fixiert. Anschließend wurden die Präparate luftgetrocknet und bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei -20°C aufbewahrt.

d. Immunfluoreszenz

Fluoresceinisothiocyanate (FITC) - konjugiertes Pferde-anti-TW-Globulin - wurde von der Fa. Behringwerke, Marburg, bezogen. Nach Rekonstitution wurde das Konjugat zweimal an BHK 21 -Zellen adsorbiert, um die unspezifische Immunfluoreszenz zu entfernen. 0,05 ml einer 1 : 20 Verdünnung dieses Konjugats wurden auf den fixierten Zellrasen jedes Quadrats eines Objektträgers gleichmäßig überschichtet. Die Objektträger wurden auf ein Gestell gelegt und in einer "feuchten Kammer" 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Präparate dreimal jeweils fünf Minuten unter leichtem Rühren mit einem Magnetstab gewaschen. Nach einer 4. Spülung mit deionisiertem Wasser wurde die Gummidichtung vom Objektträger abgezogen und die Deckgläser in Einbettungsmedium aufgelegt. Die Präparate wurden bis zum Ablesen bei 4°C aufbewahrt.

e. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Betrachtung der Präparate wurde ein Karl-Zeiss-Standard Universalmikroskop benutzt. Betrieben wurde die Auflichtfluoreszenz-Anregung mit einem Erregerfilter BG 12 und einem Sperrfilter 50.

f. Beurteilung der Präparate

Zwanzig zufällige Mikroskopfelder wurden auf das Vorhandensein von fluoreszierenden Foki bei jeder Verdünnung geprüft. Ein Fluoreszierenden -Fokus bestand aus zwei oder mehr fluoreszierenden Zellen eng benachbart liegenden.

Wenn zwei oder mehr fluoreszierenden Foki in einem einzelnen Mikroskopfeld vorhanden waren, wurde dieses Feld als ein "positives" Fluoreszenzfeld gewertet. Die Anzahl der positiven fluoreszierenden Felder wurden in jedem Fall gezählt.

g. Berechnung der Titer

Die Titer wurden mittels der Kärberformel (60) berechnet (siehe II d.)

Bei der Berechnung des Virustiters bezog sich "Positiv" auf die Anzahl der positiven Fluoreszierenden - Felder; bei der Berechnung des Serum-Ak-Titers bezog sich "Positiv" auf die Gesamtzahl der gezählten Felder minus der Anzahl der positiven Fluoreszierendenfelder. Der Ak-Titer, der als FFID50 (Fluorescent Focus Inhibition Dose 50) angegeben ist, wird definiert als reziproke Serumverdünnung, die 50 % Inhibition der Fluoreszenzfokusbildung entspricht.

IV. Herstellung von Gebrauchsviruspools

1. CVS 11 (Mäusegehirn-adaptierter Stamm) zum Gebrauch im MNT.

Das Virus stand im Institut zur Verfügung. Es wurde durch intrazerebrale Inokulation (Koprowski 1973 (100)) noch zweimal im Mäusegehirn passagiert. Anschließend wurde ein Gebrauchsvirus (Seligman 1973 (143)) in einer 20 %-igen Mäusegehirnsuspension (in 0,75 % BSA enthaltendem PBS) hergestellt, in 1 ml Portionen aufgeteilt und bei -70°C aufbewahrt. Dieses Gebrauchsvirus wurde mehrmals in Vorversuchen titriert, um den Virustiter zu bestimmen und schließlich die "Optimale -Verdünnungsstufe", die 200 MLD₅₀ (Atanasiu 1973 (15)) enthielt, einzustellen.

2. CVS 11 (BHK 21-adaptierter Stamm) zum Gebrauch im RFFIT

Das BHK 21-adaptierte (Kisslung 1958 (91)) CVS 11-Stammvirus wurde 4 mal in stationären BHK 21-Monolayerzellkulturen (Falconplastikflaschen, Rouxkolben aus Glas) passagiert. Die 5. Passage des Virus wurde im rotierenden System in Rollerflaschen durchgeführt. Die extrazelluläre Gewebekulturflüssigkeit dieser Passage wurde im Test als Gebrauchsvirus verwendet. Die Passage des Virus erfolgte durch die Übertragung des infektiösen Gewebekulturüberstandes auf neue Monolayer-Zellkulturen nach Wiktor 1973 (189) und Kaplan et al. 1967 (88)).

Nach der Beimpfung der Zellkultur wurde das Zellwachstumsmedium durch BSA enthaltenden Viruswachstumsmedium ersetzt, um eine Bindung des extrazellulären Virus an das Serum zu verhindern (Matsumoto 1970 (122)). Das Gebrauchsvirus wurde nach Zentrifugation des Überstandes (um zelluläre Trümmer zu entfernen) bei -70°C aufbewahrt. Es wurde in Vorversuchen an Mäusen und in Gewebekulturen auf Infektiosität, komplementbindende Ak und hämagglutinierende Aktivitäten (Kuwert 1973 (102) (103)) getestet. Anschließend wurde durch eine Schachbretttitration Virus gegen das Anti-TW-HIS die optimale Verdünnungsstufe für den RFFIT bestimmt.

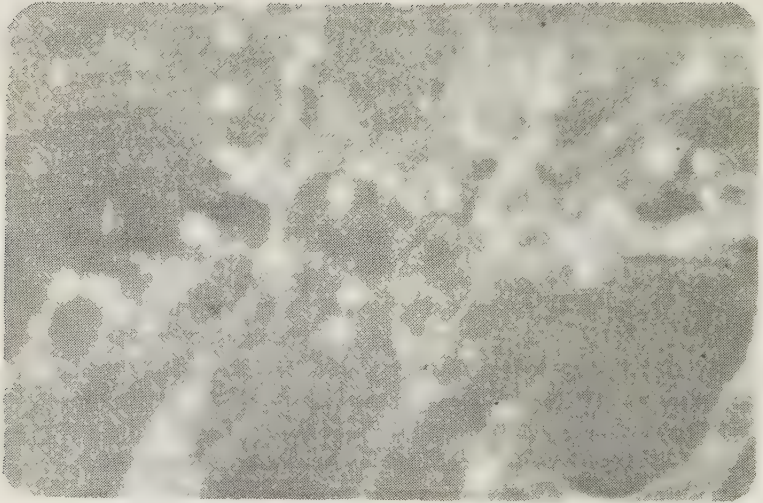


Abbildung 1b: Immunfluoreszenzpräparat einer
Tollwutvirus (TWV) infizierten
BHK 21 Monolayerzellkultur 495
fach vergrößert.
Virusstamm: CVS 11

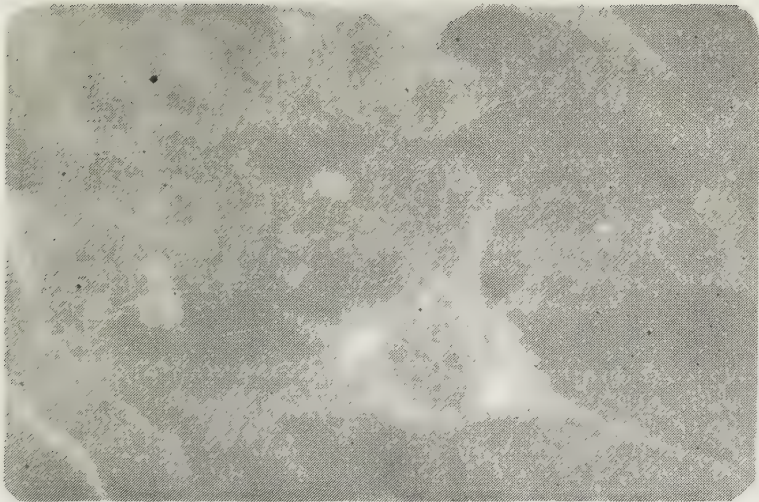


Abbildung 1c: Immunfluoreszenzpräparat einer
Tollwutvirus (TWV) infizierten
BHK 21 Monolayerzellkultur 792
fach vergrößert. Beachten intra-
zytoplasmischen Einschlußkörper-
chen.

Virusstamm: CVS 11

E. Ergebnisse

I Methodenvergleich

Aus den Abb. 1 und 2 ist ersichtlich, daß der RFFIT eine geringere Varianz der "optimalen Virusverdünnungs" Werte aufweist als der MNT. Ein entsprechendes Ergebnis für die Titration eines Tollwut-Ak-Standards (RIGH), ist aus der Abb. 3 zu entnehmen.

In den Abb. 4, 5 und 6 sind von beiden Plasmaspendergruppen die Ak-Titer des MNT gegen die des RFFIT, der KBR gegen die des RFFIT und die der KBR gegen die des MNT dargestellt. Aus den angegebenen Regressionskoeffizienten läßt sich ableiten, daß mit allen Tests im Prinzip vergleichbare Ergebnisse erhalten werden, dies gilt insbesondere aufgrund der großen Anzahl von Wertepaaren.

Wenngleich der RFFIT im Vergleich zum MNT eine geringe Variationsbreite des RIGH-Standards aufweist, zeigt sich bei den Ak-Titermittelwerten der Gruppen A und B (Tab. 7) kein signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen der einzelnen Tests. Offensichtlich bestimmt die Variation der Ak-Konzentration der einzelnen Plasmaspender die Gesamtvariation und nicht die Variation des einzelnen Testes.

Die Tatsache, daß die im MNT und in der KBR erhaltenen Ak-Titer im niedrigen Ak-Konzentrationsbereich (<1) erheblich größere Werte im RFFIT ergeben, weist zum einen auf eine höhere Sensitivität des RFFIT, zum anderen auf eine unterschiedliche Spezifität des RFFIT hin.

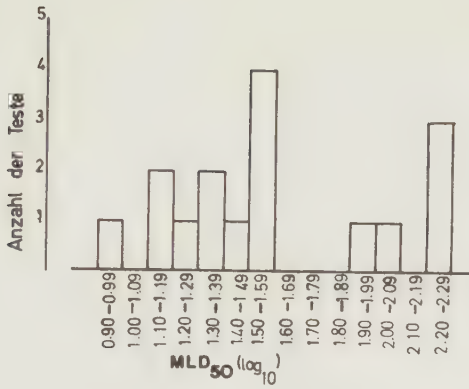


Abbildung 1: Verteilung der an 16 Tagen mittels Maus-neutralisations Test (MNT) bestimmten "optimalen Virusverdünnung" (MLD₅₀ (logarithmierte Werte))

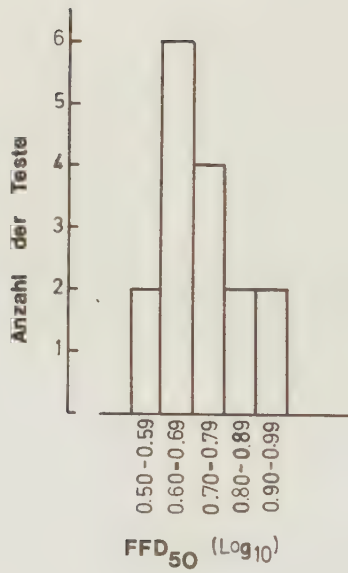


Abbildung 2: Verteilung der an 16 Tagen mittels "Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test" (RFFIT) bestimmten "optimalen Virusverdünnung" (FFD50 (logarithmierte Werte)).

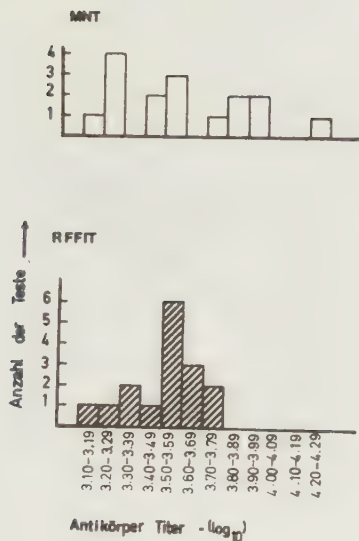


Abbildung 3: An 16 Tagen mittels "Mausneutralisations-test"(MNT) und "Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test" (RFFIT) erhalten Verteilung der Antikörper-Titer eines Tollwut-Antikörper-Standards (RIGH).

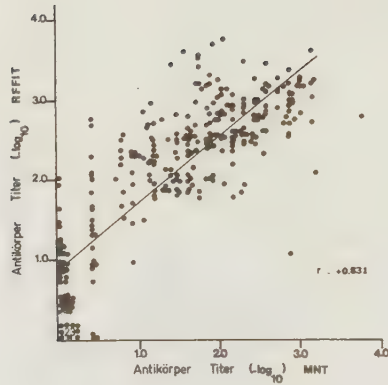


Abbildung 4 : Korrelationsdiagramm: Antikörper (Ak)-(RFFIT)
Titer/Antikörpertiter (MNT)
(logarithmierte Titer ($\log_{10}$)).
r: Korrelationskoeffizient. Anzahl der
Wertepaare = 317. Die Regressionsanalyse
ergibt $\log \text{Ak-Titer (RFFIT)} = 0,82 \log$
 $\text{Ak-Titer (MNT)} + 0,87$.

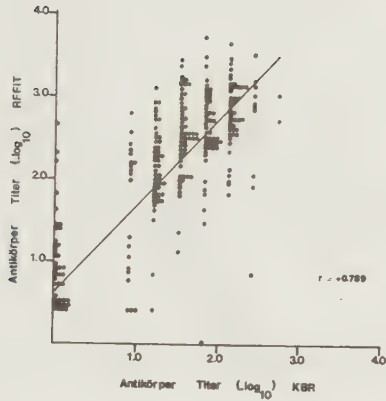


Abbildung 5 : Korrelationsdiagramm: Antikörper (Ak)-
Titer (RFFIT)/Antikörpertiter (KBR)
(logarithmierte Titer ($\log_{10}$)). Anzahl
der Wertepaare = 313. Die Regressions-
analyse ergibt $\log$ Ak-Titer (RFFIT) =
 $1,04 \log$ Ak-Titer + 0.70
r: Korrelationskoeffizient.

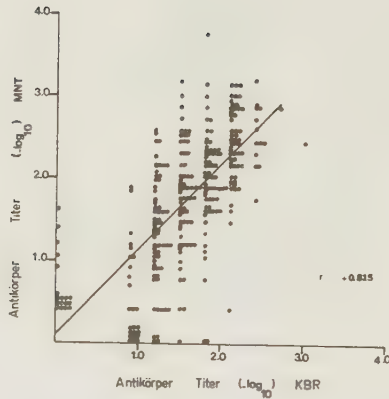


Abbildung 6: Korrelationsdiagramm:Antikörper(Ak)-
Titer MNT/Antikörpertiter KBR (log-
arithmierte Titer(log₁₀))
r:Korrelationskoeffizient
Anzahl der Wertepaare = 373
Die Regressionsanalyse ergibt log
Ak-Titer (MNT) = 1,05 log Ak-Titer(RFFIT)
+ 0900708 - 01

Tabelle 7

Antikörper-Mittelwerttiter (Ak), Standardabweichungen (s) und Anzahl (n) der Plasmaspender der Gruppe A und B zu verschiedenen Zeitpunkten nach der 1. Impfung beim RFFIT, MNT und der KBR. Titer sind als negativer $\log_{10}/0,1$ ml (RFFIT) /0,03 ml (MNT) und /0,05 ml (KBR) angegeben. Der Student-t-Test wurde für die Berechnung der Signifikanz angewendet. Signifikanzebene: $2p \leq 0,05$ signifikant. (signifikant (sig), nicht signifikant (n. sig))

Test	Tag	A			B			Signifikanz der t-werte der Mittelwertdifferenz
		Ak	s	n	Ak	s	n	
MNT	7	0,0881	0,237	41	0,0872	0,166	37	n. sig
	14	0,9865	0,548	40	1,0649	0,625	37	n. sig
	35	1,8845	0,528	37	2,1531	0,534	35	sig
	42	2,0581	0,535	37	2,3434	0,428	35	sig
	49	2,0844	0,493	34	2,3941	0,440	34	sig
RFFIT	7	0,4965	0,464	35	0,5022	0,451	31	n. sig
	14	2,0432	0,431	34	2,2012	0,440	31	n. sig
	35	2,5758	0,480	31	2,7058	0,388	29	n. sig
	42	2,5990	0,468	30	2,7796	0,444	29	n. sig
	49	2,5855	0,439	29	2,7080	0,561	26	n. sig
KBR	7	0,1983	0,410	41	0,2413	0,519	35	n. sig
	14	1,1245	0,458	38	1,1026	0,534	36	n. sig
	35	1,6213	0,322	37	1,8342	0,383	35	sig
	42	1,7080	0,375	36	1,8685	0,399	35	n. sig
	49	1,7029	0,305	34	1,9278	0,389	33	sig

Eine unterschiedliche Spezifität des MNT und der KBR könnte auch erklären, daß 15 Seren zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 7) in der KBR (MNT negativ) dagegen nur 10 im MNT (KBR negativ) positiv waren. Im übrigen traten derartige, abweichende Ergebnisse (Test 1 positiv, Test 2 negativ) am Tag 14 aber insbesondere am Tag 7 auf. Möglicherweise lassen sich mit der KBR sogenannte frühe Antikörper der IgM-Klasse besser erfassen.

Um den RFFIT zu standardisieren und den Titermittelwert der zwei Gruppen in IE (Internationale Einheiten) ausdrücken zu können, wurden die beiden verwendeten Standards (RIGH, HIS) wiederholt parallel mit dem WHO Anti-TW-Referenzserum im RFFIT und im MNT titriert (Tabelle 8).

Auf der Basis der im RFFIT ermittelten RIGH (Cutter)-Werte sind die Titermittelwerte der Gruppen A und B in Internationale Einheiten umgerechnet worden (Tabelle 9).

Die Anzahl und der Prozentsatz der Spender die 6 IE/ml an den Tagen 7, 14, 35, 42, 49 postvakzinal erreichten, sind in der Abb. 7 und in Anhang 3 wiedergegeben.

Tabelle 8

Mittels Mausneutralisationstest (MNT) und Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) erhaltene Soll- und Meßwerte zweier Standards (Hyperimmunserum (HIS), Menschliches Tollwut-Immunglobulin (RIGH)). Die angegebenen Werte wurden auf der Grundlage eines im Test mitgeführten WHO Standards von 87 Internationalen Einheiten (IE)/ml berechnet und entsprechen dem Mittelwert von 4 Testen. Der MNT wurde gegen zwei "Challenge-Virus-Dosen" ($D_1 = 7,95$ MLD 50; $D_2 = 126$ MLD 50) getestet.

Standard	Sollwert	Meßwert		
		RFFIT	MNT	
			D1	D2
RIGH (Cutter)	150	155,9	163,88	96,5
HIS	nicht bekannt	241,44	213,56	250,91

Tabelle 9 Mittels Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) erhaltene Antikörperkonzentration in Internationalen Einheiten/ml im Menzeltraum 0 - 49 Tagen nach Erstimpfung (Tag 0)

Test	Gruppe	Mittelwert ($\bar{x}$) und Bereich	Tag nach der 1. Impfung						
			0,00	7	14	35	42	49	
RFFIT	A n = 35	$\bar{x}$	0,00	0,1151	4,054	13,82	14,58	14,13	
		Bereich	0,00	0,00 - 0,9878	0,4838 - 16,775	2,598 - 116,1	2,425 - 171,659	2,21 - 201,68	
RFFIT	B n = 31	$\bar{x}$	0,00	0,1167	5,833	18,64	22,094	18,74	
		Bereich	0,00	0,00 - 1,083	0,7156 - 51,84	3,347 - 124,356	2,064 - 90,088	0,412 - 98,780	

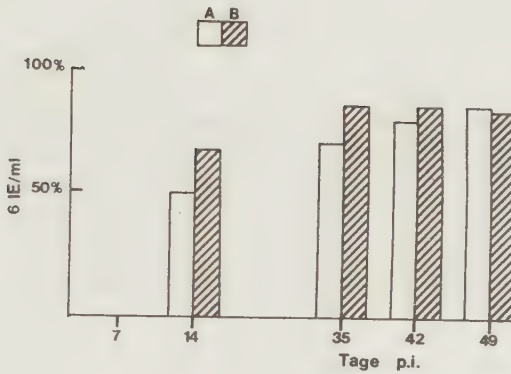


Abbildung 7: Relativer Anteil (%) der Plasmaspender, die Antikörperkonversionen von ≥ 6 Internationalen Einheiten (IE) /ml am Tag 7, 14, 35, 42, und 49 nach der Erstimpfung (Tag 0) aufweisen.

II Postvakzinale Reaktionen

Auf keiner Stufe der Immunisierung wurde von den geimpften Personen über örtliche oder systemische Nebenwirkungen berichtet.

III Kinetik der Antikörperbildung beim HDGS-geimpften Plasmaspendern

a. Prävakzinaler Immunstatus der geimpften Personen

Bei keinem Impfling waren vor der Immunisierung (Tag 0) neutralisierende Ak im RFFIT nachweisbar. Dennoch wurden bei 5 (12,2 %) Plasmaspendern der Gruppe A sowie 3 (8 %) der Gruppe B komplementbindende Ak in niedrigen Titern nachgewiesen (siehe Anhang 2). Komplementbindende Ak waren bei keinem Impfling der Kontrollgruppe nachweisbar.

b. Postvakzinaler Immunstatus der Impflinge

Bei allen in die Auswertung genommenen Personen ließen sich TW-Ak nachweisen:

Für jeden Test sind die einzelnen Ak-Titer beider Gruppen (Kontrollen und Plasmaspender) im Anhang 2 aufgeführt. Ak-Titer und Mittelwert-Ak-Titer-Kurven jeder Plasmaspendergruppe zeigen die Abb. 8 - 13. Die Kurven zeigen für jeden Test den Verlauf der Ak-Titer über einen Zeitraum von 49 Tagen mit dem geometrischen Mittelwerttiter am Tag 7, 14, 35, 42 und 49.

In der Abbildung 14 werden die geometrischen Mittelwert-Ak-Titer $\pm$ 1 Standardabweichung (s) jeder Gruppe und jedes Testes dargestellt, wobei s die individuelle Variation der Plasmaspender zeigt.

Im Serum der Plasmaspender der Gruppen A und B ließen sich schon am Tag 7 (d. h. nach nur einer Vakzinedosis) neutralisierende und komplementbindende Ak nachweisen.

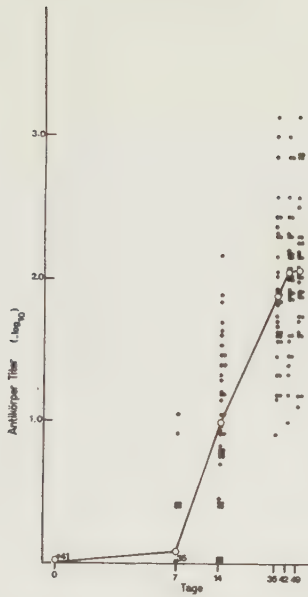


Abbildung 8: Neutralisierende Antikörper-Titer im Serum der Plasmaspender der Gruppe A; im Mausneutralisationstest (MNT) getestet. Die Titer sind in $-\log_{10}/0.03 \text{ ml}$ angegeben.

(•) = individueller Titer

(o—o) = Mittelwerttiter

Anzahl der Plasmaspender (n) = 41

Antigenwert der Vakzine 1,4

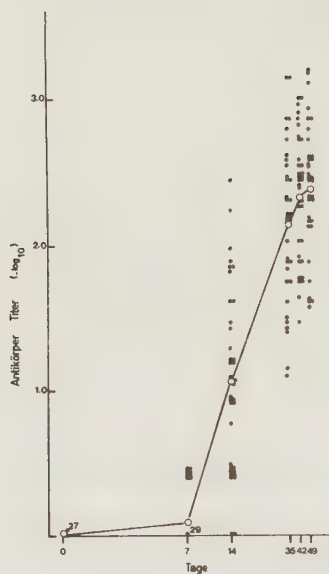


Abbildung 9: Neutralisierende Antikörper-Titer im Serum der Plasmaspender der Gruppe B; im MNT getestet. Die Titer sind in $-\log_{10}/0,03$ ml angegeben.

(•) = individueller Titer

(○—○) = Mittelwerttiter

Anzahl der Plasmaspender (n) = 37

Antigenwerte der Vakzinen = 3,1 und 1,4

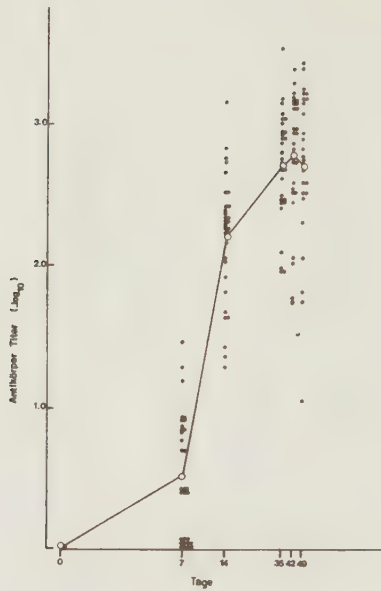


Abbildung 11: Neutralisierende Antikörper-Titer
im Serum der Plasmaspender der
Gruppe B; im RFFIT getestet. Die
Titer sind in $-\log_{10}/0,1$ ml ange-
geben.

(•) = individueller Titer

(o—o) = Mittelwerttiter

Anzahl der Plasmaspender (n) = 31

Antigenwerte der Vakzinen = 3,1 und 1,4

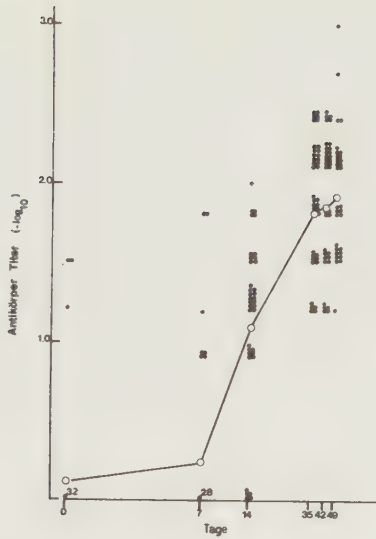


Abbildung 12: Komplementbindende Antikörper im Serum der Plasmaspender der Gruppe A. Die Titer sind in $-\log_{10}/0,05$ ml angegeben.

(•) = individueller Titer

○—○ = Mittelwerttiter

Anzahl der Plasmaspender = 41

Antigenwert der Vakzine = 1,4



Abbildung 13: Komplementbindende Antikörper im Serum der Plasmaspender der Gruppe B. Die Titer sind in $-\log_{10}/0,05 \text{ ml}$ angegeben.

(•) = individueller Titer
(○—○) = Mittelwerttiter
Anzahl der Plasmaspender = 37
Antigenwerte der Vakzinen = 3,1 und 1,4

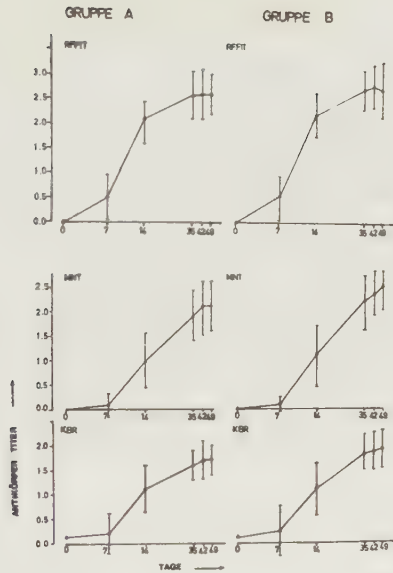


Abbildung 14: Mittelwert-Antikörper-Titer $\pm$ 1 Standardabweichung (s) der Gruppe A, und der Gruppe B beim "Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test" (RFFIT), beim Mauseutralisationstest (MNT) und bei der Komplementbindungsreaktion (KBR).

Bei den Kontrollen waren im Serum am 7. Tag nur neutralisierende Ak im RFFIT nachweisbar. Bei der Gruppe A (B) betrug die Serokonversion im RFFIT 65,7 % (64,5 %), im MNT 14,6 % (21,6%) und in der KBR 19,5 % (20 %).

Im RFFIT war eine 100 %-ige Serokonversion für die neutralisierenden Ak am Tag 14 in beiden Gruppen nachweisbar; MNT 90 % (95 %) und KBR 89,5%(86,1 %) wiesen eine niedrigere Serokonversionsrate auf (Abb. 15, 16, Anhang 4). Am Tag 35 konnte eine 100 %-ige Serokonversion in sämtlichen Testsystemen beobachtet werden. Die Gipfel-Ak-Mittelwerte beider Gruppen sind am Tag 42 im RFFIT und am Tag 49 im MNT zu beobachten. Die KBR zeigte Gipfel-Ak-Mittelwerte am Tag 42 (Gruppe A) bzw. am Tag 49 (Gruppe B). Nach dem 42. Tag zeigten die Ak-Titer beim RFFIT eine fallende Tendenz (Abb. 17).

Personen, die nicht mit einer Ak-Bildung auf die HDCS-Immunisierung reagierten (Nonresponder), waren nicht vorhanden. Bei einer Kontrollperson konnten allerdings bis zum Tag 35 keine Ak nachgewiesen werden. Da diese Person zu den folgenden Blutentnahmen nicht erschien, wurde sie bei der Auswertung dieser Untersuchung nicht berücksichtigt.

Mit Ausnahme zweier Personen der Gruppe A waren am Tag 49, d. h. zwei Wochen nach der letzten Impfung, die Ak-Titerwerte $\geq 1,13 \log_{10}$ (RFFIT) und entsprechend 0,5 IE/ml (Tab. 9).

Bei 50 % der geimpften Personen der Gruppe A bzw. 68 % der Gruppe B ließen sich bereits am Tag 14 Ak-Konzentrationen von $\geq 2,2 \log_{10}$ (RFFIT) entsprechend 6 IE/ml bestimmen (Abb. 7 (s. Anhang 3)).

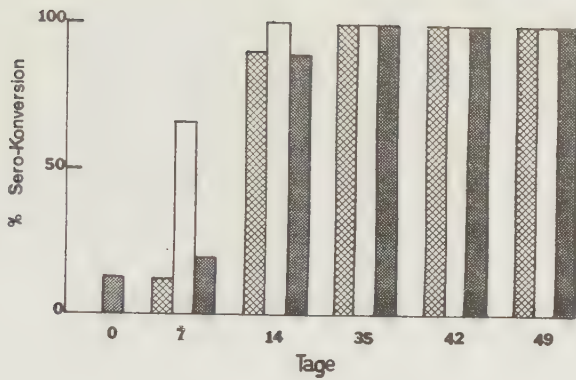


Abbildung 15: Serokonversion (%-ige) auf Tollwut (TW)-Antikörper (Ak) bei Plasma-spender der Gruppe A, im Mausneutralisationstest (MNT) , Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) , und in der Komplementbindungsreaktion (KBR) .

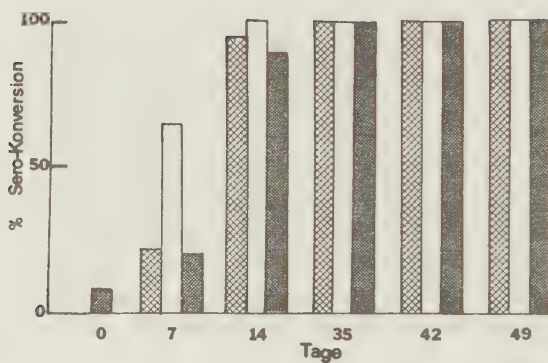


Abbildung 16: Seroconversion (%-ige) auf Tollwut (TW)- Antikörper (Ak) bei Plasma-spender der Gruppe B, im Mausneutralisationstest (MNT) , Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) , und in der Komplementbindungsreaktion (KBR) .



Abbildung 17: Mittelwert-Antikörper-Titer der Plasmaspender der Gruppe A und B im Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT), Mausneutralisationstest (MNT), und in der Komplementbindungsreaktion (KBR).

- = RFFIT- Mittelwerttiter der Gruppe A.
- = RFFIT-Mittelwerttiter der Gruppe B.
- = MNT-Mittelwerttiter der Gruppe A.
- = MNT-Mittelwerttiter der Gruppe B.
- ▲—▲ = KBR-Mittelwerttiter der Gruppe A.
- △—△ = KBR-Mittelwerttiter der Gruppe B.
- ↓ = Impfung

Alle Titer sind als $-\log_{10}$ angegeben.

- $\log_{10}/0,1$ ml im RFFIT

- $\log_{10}/0,03$ ml im MNT

- $\log_{10}/0,05$ ml in der KBR

IV Antigenwert (AW) der Vakzine mit Antikörperbildung

Es wurden zwei HDGS-Vakzinechargen verwendet, die sich voneinander um den Faktor 1,8 in AW unterscheiden. Bei der ersten Impfung wurde bei beiden Gruppen die gleiche Vakzinecharge verwendet. Ab Tag 7 wurde die Gruppe B mit der Charge, die einen höheren AW (3.1) besaß, geimpft (d. h. drei Impfungen). Mit Ausnahme des Mittelwerttiters bei der KBR am 14. Tag sind die Ak-Titer der Gruppe B am Tag 14, 35, 42, 49 im RFFIT, MNT und in der KBR höher als die der Gruppe A. Im Gegensatz dazu gab es kaum einen Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen am Tag 7 (Abb. 17).

Die "t-Werte", die unter Verwendung des "Student-t-Testes" berechnet wurden, zeigten, daß sich die Mittelwerttiter der beiden Gruppen am Tag 35, 42 und 49 beim MNT, und am Tag 35 und 49 bei der KBR signifikant unterscheiden ($2p < 0,05$). Die RFFIT-Werte der Gruppe B unterschieden sich nicht signifikant von denen der Gruppe A (Tab. 7). Nach der ersten Impfung zeigte sich eine Tendenz zu höheren Mittelwerttiterdifferenzen beim MNT zwischen den Gruppen B und A aber nicht beim RFFIT. Bei beiden Testen sind dennoch die Differenzen zwischen den Mittelwerten am Tag 14 und 7 signifikant.

Beim RFFIT ist der Mittelwerttiter am 14. Tag 20 mal größer als am 7. Tag, und beim MNT ist der Mittelwerttiter am 14. Tag 87 mal größer als am Tag 7 (Tab. 10).

Tabelle 10 Differenz der Ak-Mittelwerttiter der Gruppen A und B zu verschiedenen Zeitpunkten nach der 1. Impfung im RFFIT, MNT und in der KBR. Titer als negative $\log_{10}/0,1$ ml (RFFIT) /0,03 ml (MNT) /0,05 ml (KBR) angegeben.

Test	Tag 7	Tag 14	Tag 35	Tag 42	Tag 49
MNT	0,0009	0,0784	0,2686	0,2853	0,3097
RFFIT	0,0057	0,1580	0,1300	0,1806	0,1225
KBR	0,043	-0,0219	0,2129	0,1605	0,2249

V Einfluß der Plasmapherese auf die Antikörperbildung

Nach Kombination der beiden Gruppen A und B und der Aufteilung der Plasmaspender in Klassen (Anzahl der Plasmaspender bis zum 49. Tag) ergab sich, daß 30,1 % acht mal, 13,7 % sieben mal und 17,8 % sechs mal Plasma spendeten. Die Mittelwert-Ak-Titer des RFFIT der Plasmaspender, die acht mal gespendet hatten, schienen nicht signifikant niedriger zu sein als die Mittelwert-Ak-Titer der Klassen, die geringere Plasmapheresefrequenzen aufwiesen. In der Tat sind die Titer dieser Klasse (8 x) gleich oder wenig höher, als die Titer der Klassen, die Plasmapheresefrequenzen von 6 x und 7 x innerhalb von 49 Tagen aufwiesen. Abbildung 18 zeigt, daß über den gesamten Beobachtungszeitraum von 49 Tagen hinweg, gemessen an den im RFFIT bestimmten Titern die Ak-Bildung offensichtlich nicht von der Anzahl der Plasmaspenden beeinflusst wird.

Die Häufigkeit der Plasmaspenden war innerhalb der ersten Woche nach Beginn der Immunisierung unterschiedlich: Einige Spender wurden vor der Vakzination, andere nach der Vakzination plasmapheriert, wobei der Zeitpunkt zwischen 24 Stunden und 6 Tagen variierte. Einige Spender wurden während der ersten Woche der Immunisierung überhaupt nicht einer Plasmapherese unterzogen.

Der Vergleich der Mittelwerttiter der Gruppen (Tab. 11) läßt sich lediglich marginale Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen erkennen. Offensichtlich beeinflusst der Zeitpunkt der 1. Plasmaspende die Ak-Bildung nicht negativ. Der Mittelwerttiter der nicht plasmapherierten Gruppe scheint niedriger zu sein als der der anderen Gruppe. Der Unterschied ist allerdings auf dem Signifikanzniveau $2 p < 0,05$ mit $0,1 > p > 0,05$ statistisch nicht abzusichern.

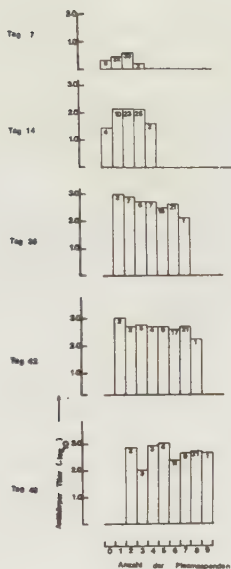


Abbildung 18: Diagramm:
Anzahl der Plasmaspender/Mittelwert-
titer (im Rapid Fluorescent Focus
Inhibition Test (RFFIT)) an verschiede-
nen Zeitpunkten nach der 1. Vakzine-
dosis innerhalb des Beobachtungszeit-
raumes. Die Zahlen in den Histogramm-
Säulen geben die Anzahl der Plasma-
spender an.

Tabelle 11 Antikörper (Ak)-Mittelwerttiter von
Plasmaspendern, die zu verschiedenen
Zeitpunkten in der 1. Woche der Immu-
nisierung plasmapheriert wurden. Titer
sind als negativ $\log_{10}/0,1$ ml angegeben.
S = Standardabweichung,
n = Anzahl der Spender.
Die Antikörper wurden im "Rapid
Fluorescent Focus Inhibition Test
(RFFIT)" bestimmt (Tag 7).

Plasmapherese am Tag	Ak	s	n
0	0,5324	0,428	34
1	0,4133	0,420	3
2	0,5367	0,4661	3
6	0,6382	0,4710	11
keine Plasmapherese	0,287	0,4524	19

VI. Unterschiedliche Antikörper-Bildung bei einzelnen Plasmaspendern

In beiden Plasmaspendergruppen (A und B) waren drei Untergruppen erkennbar, und zwar Früh (F)-, Mittel (M)- und Spät (S)-Reaktanten (R) (FR, MR, SR). Als Unterscheidungsmerkmal wurde der im RFFIT meßbare Ak-Titer am Tag 7 verwendet. Spender, die am Tag 7 $\geq 0,7 \log_{10}$ - Titerwerte aufwiesen, wurden als FR bezeichnet. Spender, bei denen keine Ak am Tag 7 nachweisbar waren, wurden als SR und solche Spender mit einem Titer zwischen 0,7 und $0,4 \log_{10}$ als MR bezeichnet. Die individuellen Ak-Titer sind in der Abb. 19 für die Gruppe A und in der Abb. 20 für die Gruppe B dargestellt. Man erkennt deutlich FR, MR und SR.

Der Mittelwert-Ak-Titer der FR der Gruppe A unterscheidet sich zu jedem Meßzeitpunkt signifikant ($2p < 0,01$) von dem der SR (Tab. 12). Das gleiche gilt, mit Ausnahme von Tag 14, für die Gruppe B. Faßt man die FR und SR der Gruppen A und B zusammen, so unterscheiden sich die Mittelwerttiter der FR von denen der SR zu jedem Zeitpunkt signifikant ($p < 0,001$) voneinander (Tab. 13).

Aus der graphischen Darstellung der Ak-Mittelwerttiter (Abb. 21) kann abgelesen werden, daß die FR Gruppe 6 IE/ml am Tage 14, und SR 6 IE/ml erst kurz vor dem 35. Tag erreicht.

Die Gruppe der FR weist außerdem während des gesamten Meßzeitraumes signifikant höhere Ak-Titer auf als die der SR.

Aus der Abb. 22 kann, da die Mittelwerttiter sowohl der FR als auch der SR unbeeinflußt von der Anzahl der Plasmaspenden zu sein scheinen, entnommen werden, daß die Plasmaspendefrequenzen nicht ursächlich für das Auftreten von FR bzw. SR ist.

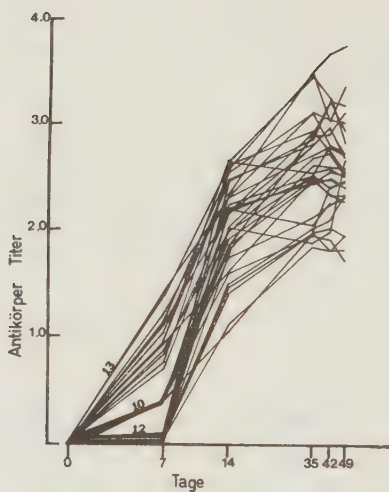


Abbildung 19: Unterschiedliche Antikörperbildungs-
kinetik bei 35 Plasmaspendern
(Gruppe A), die mit derselben
Vakzinecharge (Antigenwert =
1,4) zu den gleichen Zeitpunkten
geimpft wurden.

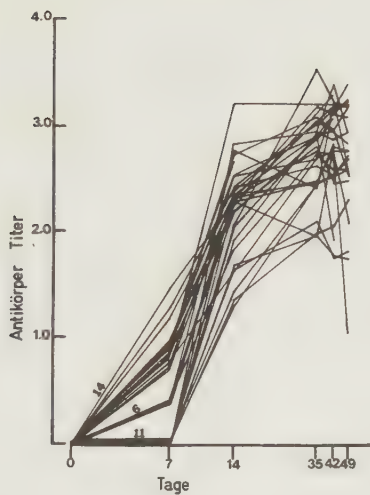


Abbildung 20: Unterschiedliche Antikörperbildungskinetik bei 31 Plasmaspendern (Gruppe B), die mit derselben Vakzinecharge (Antigenwerte = 3,1 und 1,4) zu den gleichen Zeitpunkten geimpft wurden.

Tabelle 12

Mittelwert-Antikörper-Titer (Ak, RFFIT), Standardabweichung (s) und Anzahl (n) der FR und SR in verschiedenen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraumes der Plasmaspenden der Gruppe A und B. Die Signifikanz der t-Werte der Mittelwerttiterdifferenzen wurde mit dem Student-t-Test berechnet.

Gruppe	Tag nach der 1. Dosis	FR		SR		Signifikanz ($p < 0,01$)		
		Ak	s	n	Ak		s	n
A	7	1,0299	0,227	13	0,00	-	12	
	14	2,324	0,295	13	1,857	0,483	11	sg.
	35	2,9235	0,334	12	2,268	0,354	9	sg.
	42	2,8875	0,2973	12	2,377	0,363	9	sg.
	49	2,7946	0,3178	11	2,361	0,272	8	sg.
B	7	0,9880	0,2237	14	0,00	-	11	
	14	2,405	0,343	14	1,902	0,43	11	sg.
	35	2,88	0,257	12	2,576	0,477	11	n.sg.
	42	2,986	0,273	12	2,606	0,545	11	sg.
	49	2,935	0,397	11	2,454	0,418	10	sg.

Tabelle 13

Mittelwert-Antikörper-Titer (Ak, RFFIT), Standardabweichung (s) und Anzahl (n) der FR und SR aller Plasmaspender zu verschiedenen Zeitpunkten des Beobachtungszeitraumes (signifikant: sg)

Tag nach der 1. Dosis	FR		SR		Signifikanz ($p \leq 0,001$)
	Ak	s n	Ak	s n	
7	0,98185	0,2256 27	0,00	- 23	
14	2,368	0,3175 27	1,8996	0,4698 22	sg.
35	2,901	0,2922 24	2,437	0,4443 20	sg.
42	2,9367	0,2835 24	2,5035	0,475 20	sg.
49	2,865	0,3582 22	2,435	0,3572 18	sg.

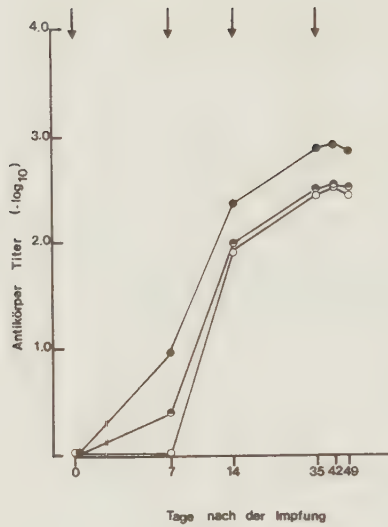


Abbildung 21: Zusammenfassung der Mittelwert-Antikörper-Titer, im Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT) der Früh-, Spät- und Mittel-Reaktanten (FR, SR und MR).

- = FR
- = SR
- ◐—◐ = MR

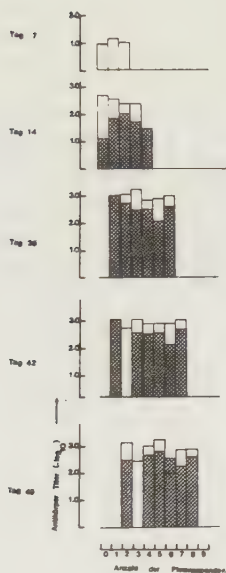


Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der Mittelwerttiter, bei dem Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)/ Anzahl der Plasmaspenden an verschiedenen Zeitpunkten nach der 1. Vakzinedosis, innerhalb des Beobachtungszeitraumes

Frühreaktanden (FR)



Spätreaktanden (SR)



Die Berechnung der Mittelwert-Ak-Titer im MNT ergab mit Hilfe der RFFIT-Unterscheidungsmerkmale - ebenfalls drei Reaktanten Gruppen (FR, MR, SR), wie die Abb. 23 für die Gruppe A und Abb. 24 für die Gruppe B zeigt. Dies weist darauf hin, daß die beobachteten Differenzen in der Antikörperbildungsfähigkeit der Probanden unabhängig von den eingesetzten Methoden nachgewiesen werden können.

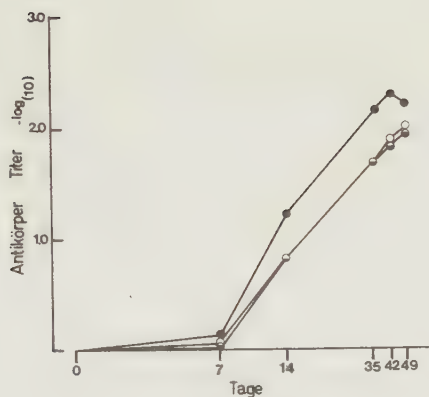


Abbildung 23: Mittelwert-Antikörper-Titer (Maus-neutralisationstest) der Früh-, Spät- und Mittel-Reaktanten der Gruppe A, zu verschiedenen Zeitpunkten nach der 1. Vakzinedosis. Antigenwert der Vakzine = 1,4.

Früh-Reaktanten ● — ●
 Spät-Reaktanten ○ — ○
 Mittel-Reaktanten ◐ — ◐

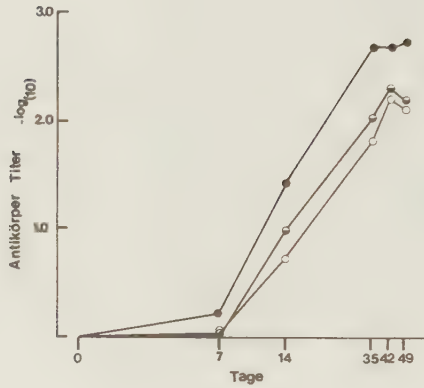


Abbildung 24: Mittelwert-Antikörper-Titer (Mausneutralisationstest) der Früh-, Spät- und Mittel-Reaktanten der Gruppe B der verschiedenen Zeitpunkte nach der 1. Vakzinedosis, Antigenwerte der Vakzinecharge = 3,2 und 1,4.

Früh-Reaktanten ● — ●
Spät-Reaktanten ○ — ○
Mittel-Reaktanten ◐ — ◐

F. Diskussion

Neben der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR), die als einfacher Test für den Nachweis von "Frühantikörpern" geeignet scheint, und dem Maus-Neutralisations-Test (MNT) als dem Standard-Test zum Nachweis neutralisierender Tollwut-Antikörper (TW-Ak), wurde in dieser Studie der Rapid-Fluorescent-Focus-Inhibition-Test (RFFIT) eingesetzt. Da mit diesem Test bisher relativ wenige Erfahrungen im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen der KBR und des MNT vorliegen, war es zunächst notwendig, diese Methode zu normieren. Gegebenenfalls könnte der RFFIT aufgrund des geringeren Zeitaufwandes und der geringeren Kosten den MNT ersetzen.

Die Ergebnisse der KBR, MNT und RFFIT-Bestimmungen in Seren von Plasmaspendern, die mit TW-Gewebekultur-Vakzinen (HDGS WI 38) geimpft worden waren, lassen sich dann auf der Grundlage dieser methodischen Untersuchungen auch in Internationalen Einheiten (IE) ausdrücken und mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichen.

I Methodenvergleich

Kuwert 1976 (104) stellt die KBR als einen einfachen Test für die Bestimmung und Quantifizierung von Ak in HDGS-geimpften Personen dar, wenn hoch gereinigtes und konzentriertes Virion-Antigen verwendet wird.

Der Standard-Test für den Nachweis neutralisierender Ak im Serum ist der MNT (Atanasiu 1973 (15)). Der MNT ist allerdings relativ zeitaufwendig und teuer. Der MNT weist darüber hinaus eine relativ große Varianz gegenüber dem RFFIT auf. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von

Fitzgerald et al. 1975, 1979 (53, 54) sowie Louie et al. 1975 (117) überein.

Aus der vorliegenden Arbeit läßt sich ableiten, daß mit allen Testen im Prinzip vergleichbare Ergebnisse erhalten werden.

Die Tatsache, daß die im MNT und in der KBR erhaltenen Ak-Titer im niedrigen Ak-Konzentrationsbereich höhere Werte im RFFIT ergeben, weist zum einen auf eine höhere Sensitivität, zum anderen auf eine unterschiedliche Spezifität des RFFIT hin. Eine höhere Sensitivität des RFFIT wurde auch von Smith et al. 1973 (156), Louie et al. 1975 (117) sowie Cho und Fenje 1975 (31) gefunden.

Da der RFFIT kostengünstiger und weniger zeitaufwendig ist als der MNT, sollte in Zukunft die Ak-Bildung an Hand des RFFIT und ggf. der KBR verfolgt werden. Die WHO (183) empfiehlt lediglich den RFFIT.

II Postvakzinale Reaktionen

Auf keiner Stufe der Immunisierung wurde von den geimpften Personen über örtliche oder systemische Nebenwirkungen berichtet. Die gleiche Beobachtung wurde erstmals von Wiktor et al. 1973 (190) gemacht und bis heute in einer großen Anzahl von Impfstudien bestätigt.

Lediglich Bøe und Nyaland 1980 (25) beobachteten bei einem 15-jährigen Jungen während der Impfung mit HDCS-Vakzine (WI 38) eine ausgeprägte neurologische Reaktion. Bei der 2. Vakzinedosis der präexpositionellen Impfung trat ein Guillain-Barré-Syndrom auf. Ob diese Reaktion tatsächlich infolge der Impfung auftrat, oder etwa auf eine Verunreinigung des Impfstoffes zurückzuführen ist, bleibt allerdings

offen. Kuwert et al. 1978 (108) konnten örtliche wie systemische Nebenwirkungen bei Verimpfung einer HDCS-Vakzine charge auf die Verunreinigung des Impfstoffes mit bakteriellen Lipopolysacchariden zurückzuführen. Bei dem von Bøe und Nyaland beschriebenen Fall ist auch zu diskutieren, ob womöglich ein zufälliges Zusammentreffen der Impfung mit einem ohnehin in der Entstehung befindlichen Guillain-Barré-Syndrom stattfand. Die Impfung wäre in einen solchen Fall dann kausativ an dem Krankheitsprozeß gar nicht beteiligt.

III Kinetik der Antikörperbildung

a. Prävakzinaler Immunstatus

Der Nachweis komplementbindender Ak in niedrigen Titern bei 8 Plasmaspendern vor der Impfung könnte, da keine Entsprechung beim MNT bzw. RFFIT vorhanden ist, und die Personen sicherlich keinen Kontakt mit dem TWV hatten, lediglich im Sinne einer unspezifischen Reaktion erklärt werden.

b. Postvakzinaler Immunstatus

1. HDCS-Impfschema

Für die präexpositionelle HDCS-Impfung existiert eine ganze Reihe unterschiedlicher Impfschemata, wobei die Anzahl der Dosen, die Verabreichungszeiten und der Antigenwert (AW) stark variierten. Seitdem allerdings Bahmanayar 1974 (20) und Cabasso et al. 1974 (28) zeigen konnten, daß nach Verabreichung von 4 Dosen höhere Ak-Titer beobachtet wurden als z. B. nach Applizierung von 3 Dosen, hat sich im Prinzip ein 4-Dosen-Schema durchgesetzt.

Das Impfschema von Cabasso et al. 1974 (28) (0, 7, 14, 28) diene als Grundlage für das hier verwendete Schema (0, 7, 14, 35). Nach Cabasso et al. 1974 (28) (27) wird nämlich bei diesem Schema die geforderte Ak-Konzentration von mindestens 6 IE/ml im HIS-Plasmapool in optimaler Weise erhalten. Diese Minimal-Ak-Konzentration gewährleistet dann eine annehmbare Ak-Konzentration von 150 IE/ml im Endprodukt RIGH.

Die 4. Dosis wird, in hier verwendeten Schema, am Tag 35 appliziert, anstatt am Tag 28 (wie von Cabasso et al. 1974 (28) vorgeschlagen). Der spätere Zeitpunkt wurde gewählt, um einen stärkeren "Boostereffekt" herbeizuführen. Kuwert et al. 1976 (104) beobachteten nämlich bei Verabreichung der HDCS-Vakzine (Wi 38) am Tag 0, 28, 56 - im Verhältnis zur Applizierung am Tag 0, 7, 14 - eine relativ langsame Ak-Bildung und eine längere Persistenz der Ak (Boostereffekt).

2. Impferfolg

Bei allen in die Auswertung genommenen Personen ließen sich TW-Ak nachweisen.

Ein Vergleich der Ak-Titer und Serokonversionsraten mit Befunden anderer Autoren ist nur in begrenztem Umfang möglich, da selbst bei Verabreichung von 4 Dosen erhebliche Differenzen der Verabreichungszeiträume vorhanden sind. Die Studie, die den gewählten Bedingungen am ehesten nahe kommt, ist die von Cabasso et al. 1974 (28). Obwohl dabei eine HDCS-Vakzine von AW = 10 verwendet wurde, sind die aufgrund der RFFIT-Werte in IE/ml errechneten Werte erheblich niedriger als die in dieser Studie (in Klammern gesetzt) gemessenen und betragen am Tag 7 : 0,16 (Gruppe A + B : 0,1), am Tag 14 : 0,3 (Gruppe A: 4,1, Gruppe B: 5,8), am Tag 28 : 0,7 und am Tag 35 (Gruppe A: 13,8, Gruppe B : 18,6). Die 100 %-ige Serokonversion (MNT) beobachteten

Cabasso und Mitarbeiter am Tag 28; der entsprechende Wert wurde hier am Tag 35 gemessen. Die geringere Ak-Konzentration in der Cabasso Studie könnte darauf zurückzuführen sein, daß keine Plasmaspender geimpft wurden.

Ein "Boostereffekt" (4. Dosis 2 Wochen nach der 3. Dosis) könnte auch erklären, daß Bahmanyar 1974 (22) und Lehmann et al. 1978 (131) ähnliche Titer am Tag 35 beobachteten, obwohl sie ein anderes Impfschema (0, 3, 7, 21) verwendeten. Der geringere "Boostereffekt" könnte dann auch erklären, daß Shah et al. 1976 (149) Plotkin et al. (135) sowie Turner 1976 (170) mit dem 0, 3, 7, 14 - Impfmodus zwar eine 100 %-ige Serokonversion zwischen Tag 28 und 35 beobachteten, die Ak-Konzentrationen in IE/ml allerdings niedriger waren als die in dieser Arbeit gemessenen.

Eine größere Empfindlichkeit und Spezifität des RFFIT könnte dafür verantwortlich sein, daß zum einen 100 %-Serokonversion - im Gegensatz zu den beiden anderen Testen - bereits am Tag 14 nachweisbar ist und zum anderen die Titer am Tag 42 leicht abzufallen beginnen.

Die Forderung der WHO 1978 (220), daß bei präexpositioneller Impfung 4 Wochen nach der letzten Impfung noch eine Ak-Konzentration von 0,5 IE/ml nachweisbar ist, wurde mit Ausnahme zweier Personen der Gruppe A erfüllt. Außerdem entsprechen die Ergebnisse einer weiteren Forderung der WHO, wonach bei postexpositioneller Impfung ein Gewebekultur-Impfstoff innerhalb von 21 Tagen Serokonversionsraten von 100 % im RFFIT hervorrufen sollte.

Ferner konnte die von Cabasso 1974 (27) geforderte Ak-Konzentration von mindestens 6 IE/ml bei 50 % (Gruppe A) bzw. 68 % (Gruppe B) der geimpften Personen bereits am Tag 14 nachgewiesen werden.

IV. Antigenwert (AW) der Vakzine und Antikörperbildung

Der AW einer Gewebekultur-Vakzine, wie der HDCS-Vakzine Wi 38, wird mit dem "National Institute of Health Potency (NIHP) Test bestimmt (WHO 1975 (180)).

Der AW ist definiert als

AW = Vakzine-Verdünnung, die 50 % der Mäuse schützt
Entsprechende Verdünnung einer Referenz-Vakzine
(WHO, NIH)

und vermittelt Information über den Antigengehalt.

Ein Zusammenhang zwischen AW und Impferfolg - meßbar an den Ak-Titern - ist nicht eindeutig gesichert.

Soulebot et al. 1974 (160) konnten nachweisen, daß die Antikörperkonzentration proportional zum Antigengehalt der Vakzine zunimmt. Die WHO 1975 (180) berichtete ebenso wie Sikes et al. 1971 (154), daß Vakzinen mit größerem AW die Versuchstiere besser gegen das "Straßen-Virus" schützen als solche mit niedrigerem AW. Bahmanyar et al. 1976 (21) beobachteten ebenso wie Kuwert et al. 1978 (108), daß Personen, die mit HDCS Vakzinen mit höheren AW geimpft wurden auch höhere Ak-Titer zeigen.

Lavender 1973 (111) sowie Plotkin et al. 1976 (135) konnten dagegen einen proportionalen Zusammenhang zwischen AW und Ak-Titer nicht feststellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf einen proportionalen Zusammenhang zwischen AW und Ak-Titer hin. Es zeigt sich nämlich, daß bei den Plasmaspendern der Gruppe B, die bei den letzten drei Impfungen an Stelle der Vakzine mit dem AW = 1,4 (Gruppe A) eine Vakzine

mit $AW = 3,1$ erhielten, höhere Mittelwerttiter in allen Testen am Tag 14, 35, 42 und 49 nachweisbar sind als bei denen der Gruppe A. Diese Mittelwerte sind signifikant erhöht am Tage 35, 42 und 49 beim MNT, am Tag 35 und 49 bei der KBR. Beim RFFIT besteht keine signifikante Erhöhung. Darüberhinaus läßt sich am Tag 7 keine signifikante Differenz der Mittelwert, Ak-Titer der Gruppen A und B beim RFFIT und MNT beobachten. Die fehlende statistische Absicherung der erhöhten Mittelwerttiter beim RFFIT könnte Folge der unterschiedlichen Sensitivität und Spezifität dieses Tests gegenüber des MNT und der KBR sein. Mit Kuwert et al. 1978 (108) kann postuliert werden (da höhere Mittelwerttiter bei der Gruppe beobachtet wurden), daß der virale Antigengehalt der hier verwendeten Vakzinen auf dem steigenden Teil der Dosis/Wirkungs-Kurve liegt. Es kann dann - für die Herstellung von TW-Ig aus Plasma geimpfter Personen - davon ausgegangen werden, daß Vakzinen mit höheren AW (4,0 - 5,0) noch höhere Ak-Titer induzieren sollten.

Im übrigen empfiehlt die WHO (182, 183), Gewebekultur-Vakzinen mit einem minimalen AW von 2,5 zu verwenden.

V. Einfluß der Plasmapherese auf die Antikörperbildung

Da Impfstudien nicht vorliegen, die den Einfluß der Plasmapherese auf die Ak-Bildung bei HDCS-geimpften Personen untersuchen, werden im folgenden einige Ergebnisse allgemeiner Art vorgestellt.

Nach Kliman et al. 1964 (93) führt die einmalige Entnahme von bis zu 1 l Blut bei Blutspendern nicht zu Veränderungen der Serumprotein-Konzentrationen, und die Abnahme von mehr als 1,5 l mittels Plasmapherese über einen Zeitraum von 23 Wochen verursachte nur geringfügige Veränderungen der Serumprotein-Konzentrationen. Bei Entnahme von 5 l Plasma innerhalb von 5 Tagen kann es jedoch zu einem starken Abfall der Serumprotein-Konzentrationen kommen. Shanbron et al. 1972 (150) fanden keine signifikante Verminderung der Plasmaprotein-Konzentrationen bei Individuen, die mit Tetanus-Toxoid hyperimmunisiert worden waren und über einen Zeitraum von 18 Monaten 1200 ml Plasma wöchentlich spendeten. Es ließ sich allerdings eine vorübergehende Verminderung der IgG-Konzentrationen (noch innerhalb der normalen Grenzwerte) beobachten.

Smolens et al. 1957 (157) sowie Lundstrom und Ramgren 1958 (118) konnten die Persistenz hoher Ak-Titer gegen Pertussis-Antigen bei Plasmaspendern (ca. 500 ml/Woche) beobachten. Smolens et al. 1957 (157) stellten darüber hinaus eine Zunahme der Ak-Titer im Verlauf der Plasmapherese fest.

Bei der wöchentlichen Entnahme von 600 ml Plasma - wie in dieser Studie geschehen - sollte, im Hinblick auf die angegebene Literatur, kein negativer Effekt auf die TW-Ak sichtbar werden. In der Tat läßt sich statistisch kein

Einfluß der Anzahl der Plasmaspender noch des Zeitpunktes der Abnahme auf die Ak-Konzentrationen nachweisen. Es scheint sogar eher so zu sein, daß die durch HDCS-Impfung induzierten TW-Ak-Konzentrationen in der nicht plasmapherierten Gruppe niedriger sind als die in der plasmapherierten Gruppe.

VI. Unterschiedliche Antikörper-Bildung bei einzelnen Plasmaspendern

Cabasso 1976 (29) und Mean et al. 1978 (123) vermuteten bereits aufgrund der großen biologischen Varianz der Ergebnisse von Immunisierungsstudien mit TWV-Vakzine beim Menschen, daß die Ak-Bildung von einem Individuum zum anderen beträchtlich variiert. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen diese Vermutung. Es ließen sich nämlich zwei Gruppen von Personen statistisch unterscheiden: Eine Gruppe (FR), die frühzeitig relativ hohe Ak-Titer aufweist, sowie eine Gruppe (SR), bei der sich erst relativ spät und in signifikant niedrigeren Konzentrationen Ak nachweisen lassen. Eine Gruppe von Personen (MR), deren Ak-Titer zwischen denen der FR und SR liegen, läßt sich allerdings statistisch nicht definieren.

Die Bezeichnung FR bzw. "High Responder" und SR bzw. "Low Responder" oder "Non Responder" sind Begriffe, die vom Tiermodell abgeleitet sind. Sie beziehen sich auf solche Tiere, deren Auseinandersetzung mit einem Antigen, z. B. Virus mit einer unterschiedlichen Immunreaktion, ausfällt. Die Stärke der Immunreaktion scheint zumindest bei Mäusen genetisch bedingt zu sein ((Mullbacher und Blanden 1979 (126), Blanden et al. 1975 (23), Doherty et al. 1978 (45), Zinkernagel et al. 1978 (196))).

Nach Hyperimmunisation mit Tetanis-Toxoid beobachteten Equem und Bona 1977 (48) mittels "in Vitro - Blastentransformation" der Lymphozyten bei 15 Versuchspersonen eine "High Responder" - Gruppe und eine "Low Responder" - Gruppe. Diese Differenzen erklärten sie, seien auf das Vorhandensein von B-Zellen mit Suppressoraktivität gegenüber T-Zellen zurückzuführen.

Da sich mit dem RFFIT bereits am Tag 7 SR und FR unterscheiden lassen, könnte dieser Test als frühzeitiges Indikatorsystem zur Identifizierung der SR dienen. Diese Gruppe könnte dann einem anderen Impfschema zugeführt werden, z. B. durch Erhöhung der Dosis pro Impfung, vermehrte Impfungen oder Verwendung einer Vakzine mit höherem AW.

G. Zusammenfassung

Die Kinetik der Antikörper (Ak)-Bildung wurde bei 77 Plasmaspendern und 7 Nicht-Plasmaspendern (Kontrollen) nach Vakzination mit der Human Diploid Cell Strain (HDCS)-Vakzine (Wi 38) mittels des "Rapid Fluorescent Focus Inhibition" Testes (RFFIT), des Maus-Neutralisations-Testes (MNT) und die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) verfolgt.

1. Alle Teste liefern im Prinzip vergleichbare Ergebnisse. Der RFFIT scheint sensitiver als die anderen Teste zu sein. Da er kostengünstiger, weniger zeitaufwendig ist und eine geringere Variationsbreite aufweist als der MNT, sollte er neben der KBR für die Kontrolle der TWV-Ak eingesetzt werden.

2. Bei der präexpositionellen Impfung mit der HDCS-Vakzine an den Tagen 0, 7, 14, 35 ließen sich bei allen Personen TW-Ak nachweisen. Die am Tag 35 nachweisbare 100 %-ige Serokonversion stimmt mit den Angaben anderer Autoren überein.

Die Forderung der WHO, daß bei präexpositioneller Impfung 4 Wochen nach der letzten Impfung eine Ak-Konzentration von 0,5 IE/ml vorhanden ist, konnte ebenso erfüllt werden, wie die, wonach bei postexpositioneller Impfung Konversionsraten von 100 % innerhalb von 21 Tagen, gemessen im RFFIT, erreicht werden. Außerdem waren die mittleren Ak-Konzentrationswerte ≥ 6 IE/ml. Diese Konzentration wird von Cabasso gefordert, um ein TW-Immunglobulin (HIS) mit akzeptabler Ak-Konzentration zu erhalten. Aus diesen Gründen scheint der verwendete Impfschema (mit der HDCS-Vakzine) sowohl für die Prophylaxe - damit auch zur HIS Herstellung - als auch für die postexpositionelle Impfung geeignet.

3. Mit zunehmendem Antigenwert (AW) der Vakzine wird auch die Ak-Konzentration nach Vakzination größer.
4. Die Anzahl sowie der Zeitpunkt der Plasmaspenden beeinflusst die Ak-Bildung nicht negativ. Es scheint sogar eher so zu sein, daß die durch die HDGS-Impfung induzierten TW-Ak-Konzentrationen in der "Nicht-Plasmapherese"-Gruppe niedriger sind als die in der "Plasmapherese"-Gruppe.
5. Es lassen sich statistisch zwei Gruppen von Reaktanden nachweisen: "Früh bzw. High Responder" (FR) und "Spät bzw. Low Responder" (SR). Beide Gruppen reagieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Intensität auf das gleiche Antigen: FR früher und intensiver als SR. Eine Gruppe von Personen (MR), deren Ak-Titer zwischen denen der FR und SR liegen, läßt sich allerdings statistisch nicht definieren.

Da sich mit dem RFFIT bereits am Tag 7 SR und FR unterscheiden lassen, könnte dieser Test als frühzeitiges Indikatorsystem zur Identifizierung der SR dienen. Diese Gruppe könnte dann einem anderen Impfschema zugeführt werden.

Summary

The kinetics of antibody (Ab) formation were followed in 77 plasma donors, and 7 non plasma donors (controls) after vaccination with the Human Diploid Cell (HDC-) strain vaccine (Wi 38) by means of the Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT), Mouse neutralisation test (MNT) and the Complement-Fixation test (CFT).

1. Comparable results are obtained in all 3 Tests. The RFFIT appears to be more sensitive than the MNT and the CFT. Since it is cheaper, quicker, and shows a narrower range of variation than the MNT, it should be used along with the CFT for the surveillance of Rabies antibody.
2. All persons, who were vaccinated pre-exposure with HDC-strain vaccine on days 0, 7, 14, 35 demonstrated Rabies antibody in their serum.
The 100 % Seroconversion (MNT) obtained on day 35 agrees with the results of other authors.

The requirements of the World Health Organisation (WHO) that a minimum antibody titre of 0,5 International Units (IU/ml) should be demonstrated in the Sera of persons 4 weeks after the last dose of HDC-vaccine, as well as a 100 % Seroconversion demonstrable in the RFFIT, within 21 days post vaccination among Postexposure vaccinees were fulfilled.

Besides mean antibody titers ≥ 6 IU/ml were achieved. A serum plasma antibody concentration of ≥ 6 IU/ml was recommended by Cabasso as acceptable in order to obtain a rabies immunoglobulin with a reasonable antibody concentration.

Hence it appears that this immunization schedule with the HDC-strain vaccine would be suitable for pre-exposure prophylaxis, -ie. also for the preparation of Hyper-immune serum- as well as for post-exposure immunization.

3. A higher antibody titre is obtained after vaccination with a vaccine having a higher Antigenic value (AV).
4. Neither the number of plasma donations made by an individual nor the time (day) at which the individual was subjected to Plasmapheresis negatively influenced the formation of antibody. In fact it appears that the HDC-strain vaccine induced antibody titres which are lower in the 'non-plasmapheresis' group than in the 'plasmapheresis' group.
5. One could statistically differentiate between 2 groups of reactants. "Early / High Responders" (ER) and "Late/ low responders" (LR). Both groups reacted at different rates and with different intensities of antibody formation to the same antigen. The ER reacted earlier and with higher antibody titres than the LR. A third group of individuals -"Intermediate responders" (MR), whose antibody titer lay between that of the ER and LR, could not be statistically defined.

Since by means of the RFFIT one can differentiate between "ER" and LR on day 7, this Test could serve as an indicator-system for the early detection and identification of LR, whereupon a changed vaccination schedule could be used for the further vaccination of this group of individuals.

Literaturverzeichnis

1. Aaslestad, H.G.
Wiktor, T. J.
"Recovery of protective activity in rabies virus vaccines concentrated and purified by four different methods".
Appl. Microbiol. 24 (1) 37-43 (1972).
2. Abdussalam, M.
Bögel, K.
"The problem of antirabies vaccination".
in International Conference on the application of vaccines against Viral, Rickettsial, and Bacterial Diseases of Man".
PAHO Sc. publication 226 54-59 (1971).
3. Abdussalam, M.
Botton, P. C.
"Global aspects of rabies".
in International Symposium on Rabies, Lyon 1972.
Symp. Series. immunobiol.
Standard 21 3-7 (Karger Basel/ New York 1974).
4. Ajjan, N.
Soulebot, J. P.
Stellmann, C.
Biron, G.
Charbonnier, C.
Triau, R.
Mérieux, C.
"Resultats de la vaccination antirabique preventive par le vaccin inactif concentré souche rabies PM/Wi 38 - 1503-3M cultivée sur cellules diploïdes humaines". Develop. biol. Standard. 40 81-100 (S. Karger Basel 1978).

5. Anderson, J. A.
Daly, Frank T. (jr)
Kidd, Jack C.
"Human rabies after antiserum
and vaccine post-exposure treat-
ment Ann. Intern. Med. 64 (6)
1297 - 1302 (1966).
6. Anderson, G. R.
Sgouris, J. T.
"The preparation of rabies immune
globulin and use in monkeys
following virus challenge".
in International symposium on
Rabies, Talloires 1965, Symp.
Series. immunobiol. Stand. 1
105 - 117 (Karger Basel/New
York 1966).
7. Aoki, Fred Y.
Tyrrell, D. A. J.
Hill, L. E.
Turner, G. S.
"Immunogenicity and acceptability
of a Human Diploid Cell culture
rabies vaccine in volunteers".
Lancet 1 660 - 662 (1975).
8. Appelbaum, E.
Greenberg, H.
Nelson, J.
"Neurologic complications follo-
wing antirabies vaccine".
JAMA 151 181 - 191 (1953).
9. Archer, B. G.
Dierks, R. E.
"Effects of Homologous or Hetero-
logous antiserum on neutralizing
antibody response to rabies
vaccine". Bull. WHO 39 407 - 417
(1968).
10. Aristotle,
"History of animals "Book 8,
ch. 32. Thompson D, Translator.
In Great Books of the Western
world, Encyclopedia Britannica.
1952, 9 129 Chicago (zitiert in
Hattwick 1974 (68 a)).

11. Atanasiu, P. "Rabies neutralizing antibody to
Bahmanyar, M. different schedules of serum and
Baltazard, M. vaccine inoculations in non-
Fox, J. P. exposed persons".
Habel, K. Bull WHO 14 593 - 611 (1956).
Kaplan, M. M.
Kissling, R. E.
Komarov, A.
Koprowski, H.
Lepine, P.
Pérez Gallardo, F.
Schaeffer, M.
12. wie 11. "Rabies neutralizing antibody
response to different schedules
of serum and vaccine inoculations
in non-exposed persons: part. 2".
Bull. WHO 17 911 - 932 (1957).
13. Atanasiu, P. "Rabies neutralizing antibody
Cannon, D. A. response to different schedules
Dean, D. J. of serum and vaccine inoculations
Fox, J. P. in non-exposed persons: part. 3".
Habel, K. Bull. WHO 25 103 - 114 (1961).
Kaplan, M. M.
Kissling, R. E.
Koprowski, H.
Lépine, P.
Pérez Gallardo, F.
14. Atanasiu, P. "Rabies neutralizing antibody
Dean, D. J. response to different schedules
Habel, K. of serum and vaccine inoculations
Kaplan, M. M. in non-exposed persons". part. 4.
Koprowski, H. Bull. WHO 36 361 - 365 (1967).
Lépine, P.
Serié, C.

15. Atanasiu, P. "Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin". WHO Monogr. Ser. no: 23. "Laboratory techniques in rabies". 3rd. ed. ch. 40. 314 - 318. ed. Kaplan, M., Koprowski, H. (1973).
16. Atanasiu, P.
Tsiang, H.
Gamet, A. "Nouveau vaccine antirabique humain de culture cellulaire primaire". Ann. Microbiol. (Paris) 125B, 419 - 432 (1974).
17. Atanasiu, P.
Tsiang, H.
Resculard, P.
Aguilon, F.
Lavergne, M.
Adamovicz, Ph. "Zonal purification of human rabies vaccine obtained on bovine foetal kidney cells. Biological results". Develop. biol. Standard. 40 35 - 44 (S. Karger, Basel 1978).
18. Babes, V.
Lepp, L. "Récherches sur la vaccination antirabique". Ann. Inst. Pasteur. (Paris) 3 384 (1889). (zitiert in Koprowski et al. 1954 (98)).
19. Babes, V.
Cercez, T. "L'atténuation du virus fixe rabique Ann. Inst. Pasteur, (Paris) 10, 625 (Oct) 1891. (zitiert in Cabasso 1976 (29)).
20. Bahmanyar, M. "Results of antibody profiles in man vaccinated with the HDCS vaccine with various schedules". in International Symposium on Rabies Lyon 1972 Symp. Series. immunobiol Standard. 21 231 - 239 (Karger, Basel/New York 1974).

21. Bahmanyar, M. "Successful protection of humans
Fayaz, A. exposed to rabies infection".
Nour-Salehi, S. JAMA 236 (24) 2751 - 2754 (1976).
Mohammadi, M.
Koprowski, H.

22. Baltazard, M. "Essai pratique du sérum antirabique
Bahmanyar, M. chez les mordus par loups enragés"
Ghodssi, M. Bull. WHO 13 747 (1955).
Sabeti, A.
Gadjusek, C.
Ronzbehi, E.

23. Blanden, R. V. "Genes required for cytotoxicity
Doherty, P. C. against virus infected target
Dunlop, M. B. C. cells in K and D regions of
Gardner, I. D. H-2complex".
Zinkernagel, R. M. Nature (Lond) 254. 269 - 270
David, C. S. (1975).

24. Blatt, N. H. "Reactions following antirabies
Lepper, H. prophylaxis: report on 16 patients"
Am. J. Dis. Child. 86 395 - 402
(1953).

25. Bøe, E. "Guillan-Barre Syndrome •
Nyland, H. after Vaccination with Human
Diploid cell Rabies vaccine"
Scand. J. infect. Dis 12
231 - 232 (1980).

26. Cabasso, V. J. "Rabies immune globulin of human
Loofbourow, J. C. origin: preparation and dosage
Roby, R. E. determination in non-exposed
Anuskiewicz, W. volunteer subjects".
Bull. WHO 45 303 - 315 (1971).

27. Cabasso, V. J. "Properties of rabies immune-globulin of human origin".
J. Biol. Standard. 2 43 - 50
(1974).
28. Cabasso, V. J.
Dobkin, M. B.
Roby, R. E.
Hammar, A. H. "Antibody response to a human
diploid cell rabies vaccine".
Appl. Microbiol. 27 3,553 - 561
(1974).
29. Cabasso, V. J. "Rabies immune globulin (human)
in the prevention of rabies".
Am. J. Hosp. Pharm. 33 48 - 51
(1976).
30. Cabasso, V. J.
Louie, R. E.
Lo, B.
Dobkin, M. B. "Antibody levels following W1 38
rabies vaccine".
Develop. biol. Standard. 40
231 - 235 (S. Karger Basel 1978).
31. Cho, Han C.
Penje, P. "Rabies neutralizing antibody
determination in tissue culture
by direct fluorescent antibody
technique".
J. Biol. Stand. 3 101 - 105 (1975).
32. Clarke, H. F.
Wiktor, T. J. "Rabies virus".
in "Strains of human viruses"
177 - 183. ed. Majer, M. and
Plotkin, S. A. (S. Karger Basel,
München, Paris, London, New York
1972).
33. Claxton, B. A. "Rabies: its incidence, symtoma-
tology and control in animals".
from "Some diseases of animals
communicable to man in Britain".
(proceedings of a symposium
organized by the British Veteri-
nary Association and the British
small animal veterinary association
Pergamon press-Oxford and New York
(1968)

34. Corey, L.
Hattwick, M. A. W. "Treatment of persons exposed to rabies".
J. Amer. med. Ass. 232 272
(1975).
35. Corey, L.
Hattwick, M. A. W.
Baer, G. M.
Smith, J. S. "Serum neutralizing antibody after rabies post-exposure prophylaxis".
Ann. intern. Med. 85 170 (1976).
36. Costy-Berger, F. "Vaccination antirabique preventive par du vaccin prepare sur cellules diploides humaines".
Develop. biol. Standard. 40,
101 - 104 (S. Karger, Basel 1978).
37. Cox, J. H.
Schneider, L. G. "Prophylactic immunization of humans against rabies by intradermal inoculation of Human Diploid cell culture vaccine".
J. Clin. Microbiol. 3 (2) 96-101
(1976).
38. Cox, J. H.
Klietmann, W.
Schneider, L. G. "Human rabies immunoprophylaxis using HDC (MRC-5) vaccine".
Develop. biol. Standard. 40
105 - 108 (Karger Basel, 1978).
39. Crick, J.
Brown, F. "Efficacy of rabies vaccine prepared from virus grown in duck embryo".
Lancet 1 1106 - 1107 (1970).
40. Dean, D. J.
Baer, G. M.
Thompson, W. R. "Studies on the local treatment of wounds for the prevention of rabies".
Bull. WHO 26 765 - 775 (1963).

41. Dean, D. J. "Local treatment of wounds in rabies".
in International Symposium on rabies. Talloires 1965. Symp. Series. immunobiol. Standard. 1 287 - 292 (Karger, Basel/New York 1966).
42. Dehner, Louis P. "Human rabies encephalitis in Vietnam".
Ann. Intern. Med. 72 375 - 378 (1972).
43. Dempster, G.
Stead, S.
Zbitnew, A.
Rhodes, A. J.
Zalan, E. "Management of 41 persons exposed to a rabid dog: Unplanned experience with human diploid vaccine".
Can. Med. Assoc. J. 120 (9) 1069 - 1074 (1979).
44. Dierks, R. E.
Gough, P. M.
Rubin R. H. "Comparative studies of the immunological response to duck embryo vaccine and/or human rabies immune globulin in man".
Symp. Series. immunobiol. Standard 21 267 - 276 (1974).
45. Doherty, P. C.
Biddison, W. E.
Bennink, J. R.
Knowles, B. "Cytotoxic T-cell responses in mice infected with influenza and vaccinia viruses vary in magnitude with H-2 genotype".
J. Exp. Med. 148 534 - 543 (1978).
46. Dulbecco, R.
Vogt, M. "Plaque formation and isolation of lines with poliomyelitis viruses".
J. Exp. Med. 99 167 - 182 (1954).

47. Ellenbogen, C.
Slugg, P.
"Rabies neutralizing antibody:
inadequate response to equine
antiserum and Duck embryo
vaccine".
J. Infect. Dis. 127 (4) 433 - 436
(1973).
48. Equem, A.
Bona, C.
"Studies on tetanus toxoid-
induced blast transformation of
lymphocytes of immunized healthy
donors".
Clin. Immunol. Immunopathol. 7,
1 - 9 (1977).
49. Farrar, W. E. (jr)
Warner, A. R. (jr)
Vivona, S.
"Pre-exposure immunization against
rabies using duck embryo vaccine".
Milit. Med. 1 960 - 965 (1964).
50. Fenje, P.
Pinteric, L.
"Potentiation of tissue culture
rabies vaccines by adjuvants".
Am. J. Public Health. 56
2106 - 2113 (1966).
51. Fenje, P.
"Production and control of tissue
culture rabies vaccines for
human use".
in International Symposium on
rabies. Lyon 1972, Series
immunobiol. Standard. 21 231 -
239 (Karger Basel/New York 1974).
52. Finkelstein, M. S.
Uhr, J. W.
"Specific Inhibition of antibody
formation by passively admini-
stered 19S and 7S antibody".
Science 116, 67 - 69 (1964).

53. Fitzgerald, E. A. "A collaborative study on the
Baer, G. M. potency testing of antirabies
Cabasso, V. J. globulin".
Vallancourt, R. J. J. Biol. Stand. 3 273 - 278
(1975).
54. Fitzgerald, E. A. "A collaborative study on the
Cabasso, V. J. testing of rabies immune glo-
Smith, J. S. bulin (human) by the mouse
Rastogi, S. C. neutralization test (MNT) and
the rapid fluorescent focus
inhibition test (RFFIT)".
J. Biol. Stand. 7 67 - 72 (1979).
55. Fox, J. P. "Study of antirabies immunization
Koprowski, H. Bull. WHO. 17 869 - 904 (1957).
Conwell, D. P.
Black, J.
Gelfand, M. H.
56. Fuenzalida, E. "Rabies vaccine prepared from
Palacios, R. the brain of infected suckling
mice". Boletin del Instituto
Bacterologica de Chile, 8,
3 - 10 (1955).
57. Gispen, R. "Neutralizing and Fluorescent
Saathof, B. Antibody response in man after
antirabies treatment with suck-
ling rabbit brain vaccine".
Arch. Gesamte. Virusforsch. 15
377 - 386 (1965).
58. Gispen, R. "Rabies vaccine derived from
Schmittmann, G. J. P. suckling rabbit brain".
Saathof, B. ibid. 366 - 376 (1965).

59. Greenwood, M. "Tenth report on the data of antirabies treatment supplied by Pasteur Institute". Bull. WHO 12, 301 - 364 (1945).
60. Grist, N. R. "Diagnostic methods in clinical Virology." pp 67 - 68
Ross, C. A. Blackwell Scientific publications (Oxford, London, Edinburgh, Melbourne) second edition (1974).
Bell, B. A.
61. Habel, K. "Sero-prophylaxis in experimental rabies". Public. Health. Rep. 60 545 (1945).
62. Habel, K. "Laboratory data supporting the clinical trial of antirabies serum in persons bitten by a rabid wolf". Bull. WHO. 13 773 - 779 (1955).
Koprowski, H.
63. Habel, K. "Rabies antiserum interference with antigenicity of vaccine in mice". Bull. WHO. 17 933 - 936 (1957).
64. Habel, K. "Vaccination and serum prophylaxis of rabies in man". in International Symposium on Rabies Talloires 1965, Symp. Series immunobiol. Stand. 1 293 - 305 (Karger Basel/New York, (1966)).

65. Hafkin, B.
Merry, E. A.
Baer, G. A.
"Human rabies globulin and Human
Diploid vaccine dose determina-
tion
Develop. biol. Standard. 40 121 -
127 (Karger Basel, 1978).
66. Hallmann, L.
"Klinische Chemie und Mikrosko-
pie 319 - 331 (Thieme Verlag,
Stuttgart), 1960.
67. Hattwick, M. A. W.
Hochberg, F. H.
Landrigger, P. J.
Gregg, M. B.
"Skunk associated human rabies"
JAMA 222 (1) 44 - 47 (1972).
- 68a. Hattwick, M. A. W.
"Human rabies".
Public Health Reviews 3 (3)
229 - 275 (1974).
68. Hattwick, M. A. W.
Rubin, R. H.
Music, S.
"Post-exposure rabies prophylaxis
with human rabies immune globu-
lin".
JAMA 227 407 - 410 (1974)
69. Hattwick, M. A. W.
Corey, L.
Creech, W. B.
"Clinical use of humanglobulin
immune to rabies virus".
J. Infect, Dis. 133 266 - 272
(1976).
70. Hayflick, L.
Moorhead, P. S.
"The serial cultivation
Diploid Cell strains".
Exp. Cell. Res. 25 585 - 621
(1961).
71. Held, J. R.
Lopez, A. H.
"Neurological disease in man
following administration of
suckling mouse brain antirabies
vaccine".
Bull. WHO. 46 321 - 327 (1972).

72. Henry, C.
Jerne, N. K. "Competition of 19S and 7S antigen receptors in the regulation of primary immune response".
J. Exp. Med. 128 133 (1968).
73. Herrmann, E. C. (jr) "The usefulness of human fibroblast cell lines for the isolation of viruses."
Am. J. Epidemiol. 85 200 - 206 (1967).
- 74a. Hildreth, E. A. "Prevention of rabies" or the decline of Sirius.
Ann. Intern. Med. 58 (5) 1963.
74. Hildreth, E. A. "The incidence of and problems related to allergic responses to rabies horse hyperimmune serum and duck embryo vaccine".
in International Symposium on rabies Talloires 1965; Symp. Series immunobiol. Standard. 1 313 - 317 (Karger, Basel/New York, 1966).
- 75a. Hilfenhaus, J.
Kohler, R.
Barth, R.
Majer, M.
Mauler, R. "Large scale purification of animal viruses in the RK-model zonal ultracentrifuge".
J. Biol. Standard 4 263 - 271 (1976).
75. Hosty, T. S.
Hunter, F. R. "Incidence of reactions to antirabies horse serum".
Public. Health. Rep. 68 789 - 791 (1953).

76. Hosty, T. S.
Kissling, R. E.
Schaeffer, M.
Wallace, G. A.
Dibble, E. H.
"Human antirabies gamma globulin" Bull. WHO. 20 1111 - 1119 (1959).
77. Hoyt, A.
Fish, R.
Moore, F. J.
Tracy, R. L.
"Experimental rabies in white mice". 2. Studies on passive immunity. J. Infect. Dis. 59 152 (1936).
78. Hoyt, A.
Gurley, M. K.
"Experimental street virus rabies in white mice".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 38 40 (1938).
79. Hull, R. N.
Minner, J. R.
Mascoli, C. C.
"New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells".
Am. J. Hyg. 68 31 - 44 (1958).
80. Jacobs, J. P.
Jones C. M.
Baille, J. P.
"Characteristics of a human Diploid cell designated MRC5"
Nature. 227 168 - 170 (1970).
81. Janssen, E. G.
"Tollwutschutzimpfung mit tödlichem Ausgang".
Mschr. Kinderheilk. 118 379 - 380 (1970).
82. Jeunhomme, P.
"A propos la rage vieille histoire" Presse Med. 73 1551 - 1554 (1924) (zitiert in Hattwick 1974 (68 a)).

83. Kabat, E. A.
Wolf, A.
Bezer, A. E.
"The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by infection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants".
J. Exp. Med. 85 117 - 128 (1947).
84. Kabat, E. A.
Wolf, A.
Bezer, A. E.
"Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys".
J. Exp. Med. 88 417 - 425 (1948).
85. Kabat, E. A.
Mayer, M. M.
"Experimental immunochemistry" (second edition) Charles C. Thomas Publisher, Springfield Ill., USA (1971).
86. Kaplan, M. M.
Cohen, D.
Koprowski, H.
Dean, D.
Ferrigan, L.
"Studies on the local treatment of wounds for prevention of rabies".
Bull. WHO. 26 765 - 775 (1962).
87. Kaplan, M. M.
Paccaud, M. F.
"Effectiveness of locally inoculated antirabies serum and Gamma Globulin in rabies Infection of mice".
Bull. WHO. 28 495 - 497 (1963).
88. Kaplan, M. M.
Wiktor, T. J.
Maes, R. F.
Campbell, J. B.
Koprowski, H.
"Effect of polyions on the infectivity of rabies virus tissue culture."
J. Virology 1 (1) 145 - 151 (1967).

89. Kaplan, C.
Turner, G. S.
"Removal of encephalitogenicity from extracts of normal rabbit central nervous system by treatment with Fluorocarbons".
Nature 219 445 - 446 (1968).
90. Karliner, J. S.
Beluval, G. S.
"Incidence of reactions following administration of antirabies serum" JAMA 193 (5) 109 - 112 (1965).
91. Kissling, R. E.
"Growth of rabies virus in Non nervous tissue culture".
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98 223 - 225 (1958).
92. Klietmann, W.
Domres, B.
Cox, J. H.
"Rabies post exposure treatment and side effects in man using HDC (MRC5) vaccine".
Devel. biol. Standard. 40 109 - 113 (S. Karger, Basel 1978).
93. Kliman, A.
Carbone, P. P.
Gaydos, L. A.
Freireich, E. J.
"Effects of intensive plasmapheresis on normal blood donors".
Blood 23 (5) 647 - 656 (1964).
- 94a. Kondo, A.
"Growth characteristics of rabies in Primary chick embryo cells".
Virology 27 335 - 345 (1965).
94. Kondo, A.
Takashima, Y.
Suzaki, M.
"Inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin".
Symposia Serie immunobiol. Stand. 21 182 - 189 (S. Karger Basel/New York 1974).

95. Kondo, A. "Preimmunization and post-exposure treatment with inactivated rabies vaccine of chick embryo cell culture origin. (CEC) Develop. Biol. Standard. 40 147 - 153 (S. Karger, Basel 1978).
96. Koprowski, H.
Cox. H. R. "Studies on chick embryo adapted rabies virus. 1. Culture characteristics and pathogenicity". J. Immunol. 60 553 (1948).
97. Koprowski, H.
Vanderscheer, J.
Black, J. "Use of hyperimmune antirabies serum concentrates in experimental rabies".
Am. J. Med. 1 412 - 420
1950 ..
98. Koprowski, H.
Black, J. "Studies on chick embryo adapted rabies virus".
5. Protection of animals with antiserum and living attentated. virus after exposure to street strain of rabies virus".
J. Immunol. 1 85 - 93 (1954).
99. Koprowski, H. "Pre- and post-exposure prophylaxis Present status and current trends" in Rabies. eds. Nagano. Y. Davenport F. M. University Park Press. Baltimore-London-Tokyo p 111 (1971).

100. Koprowski, H. "The mouse neutralization test".
WHO Monogr. Ser. Laboratory
Techniques in rabies. Third
edition ch. 7,85 -93 (1973)
eds. Kaplan, M. M. and Kop-
rowski, H.
101. Kuwert, E. K. "Neurologische Komplikationen
Klosterkötter, W. nach Tollwutschutzimpfung".
Linzenmeier, G. Med. Klin. 63 1326 - 1328 (1968).
102. Kuwert, E. K. "The Complement Fixation Test"
WHO Monogr. Ser. no: 23.
"Laboratory Techniques in rabies".
Third edition ch. 10,124 - 134
(1973) eds. Kaplan, M. M. and
Koprowski, H.
103. Kuwert, E. K. Haemagglutination and Haemagglu-
tination-Inhibition tests".
ibid. ch. 11, 135 - 146 (1973).
104. Kuwert, E. K. "Neutralizing and complement
Marcus, I. fixing antibody responses in
Höher, P. G. pre- and post-exposure vaccines
to a rabies vaccine produced in
human diploid cells".
J. Biol. Standard. 4 249 - 262
(1976).
105. Kuwert, E. K. "Post-exposure use of human
Marcus, I. diploid cell rabies vaccine".
Werner, J. Develop. biol. Standard. 37,
Scheirmann, N. 273 - 286 (S. Karger, Basel 1977).
Höher, P. G.
Thraenhart, D.
Hierholzer, E.
Wiktor, T. J.
Koprowski, H.

106. Kuwert, E. K.
Marcus, I.
Werner, J.
Höher, P. G.
Thraenhardt, O.
Hierholzer, E.
Iwand, A.
Helm, E. B.
Wiktor, T. J.
Koprowski, H.
"Postexpositionelle Schutz-
impfung des Menschen gegen
Tollwut mit einer neuen ent-
wickelten Gewebekulturvakzine
(HDGS-Impfstoff) Zbl. Bakt.
Hyg. 1. Abt. Orig. A 239.
437 - 458 (1977).
107. Kuwert, E. K.
"Tollwutschutzimpfung mit HDGS
(Gewebekulturvakzine: ein ent-
scheidender Durchbruch bei der
sogenannten "Wutschutzbehandlung"
des Menschen).
Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 85
273 - 279 (1978).
108. Kuwert, E. K.
Marcus, I.
Werner, J.
Iwand, A.
Thraenhardt, O.
"Some experiences with Human
Diploid cell strain (HDGS)
rabies vaccine in pre- and post-
exposure vaccinated humans".
Develop. biol. Standard. 40
79 - 88 (S. Karger Basel 1978).
109. Kuwert, E. K.
Werner, J.
Marcus, I.
Cabasso, V. J.
"Seroimmunization by Human immune
globulin and HDGS vaccine against
rabies".
ibid. 129 - 136 (1978).
110. Lavender, J. F.
"Purified rabies vaccine
(suckling rat brain origin)".
Appl. Microbiol. 19 923 (1970).

111. Lavender, J. F. "Immune response in Primates vaccinated with duck-embryo cell culture rabies vaccine". Appl. Microbiol. 25 (3) 327 - 331 (1973).
112. Lehmann, H. G.
Kuwert, E. K.
Henessen, W.
Widmark, R. "Erfahrungen beim Menschen mit gereinigten Tollwut-Impfstoff aus menschlichen diploiden Zellkulturen". Münch. Med. Wochenschr. 120, 289 - 292 (1978).
- 113a. Lentz, T. L.
Burrage, T. G.
Smith, A. L.
Crick, T.
Tignor, G. H. "Is the Acetylcholine Receptor a Rabies Virus Receptor"? Science 215, 182 - 184 (1982).
113. Lepine, P.
Atanasiu, P. "Production of antirabies serum of animal origin." WHO Monogr. Ser. no: 23, "Laboratory Techniques in rabies" ed. Kaplan, M., Koprowski, H. ch. 37, 299 (1973).
114. Linzenmeier, G.
Kuwert, E. K. "Die Enzephalitogenität der Hempt Vakzine beim Menschen Neurologischen Komplikationen nach Tollwutschutzimpfung in der Bundesrepublik von 1955 bis 1968". in Schoop. G. G. Wachdörfer, G. Linzenmeier, E. K. Kuwert, (ed.). Aktuelle Probleme der Tollwut Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig. Suppl. 3102 (1970).

115. Loofbourow, J. G.
Cabasso, V. J.
Roby, R. E.
Anuskiewicz, W.
"Rabies immune globulin (Human)
Clinical trials and Dose
determination".
JAMA 217 (13) 1825 - 1831 (1971).
116. Lopez-Adaros, H.
Held, J. R.
"Guillan-Bárre syndrome
associated with immunization
against rabies epidemiological
aspects" in "Immunological
disorders of the nervous system
178 (Res. Publ. Vol. 49) 1971
The Association for Research in
Nervous Diseases.
117. Louie, R. E.
Dobkin, M. E.
Meyer, P.
Chin, B.
Roby, R. E.
Hammar, A. H.
Cabasso, V. J.
"Measurement of rabies antibody.
Comparison of the mouse neutrali-
zation test (MNT) with the Rapid
Fluorescent Focus Inhibition test
(RFFIT)". J. Biol. Standard. 3
365 - 373 (1975).
118. Lundstrom, R.
Ramgren, O.
"Plasmapheresis in the prepara-
tion of hyperimmune serum".
Scandinavian. J. Cl. and Lab.
Investigation 10 (2) 119 - 121
(1958).
119. Mckendrick, A. G.
"The ninth analytical review of
reports from Pasteur Institute
on the results of antirabies
treatment".
Bull. Health. Org. League of
Nations. 9 31 (1940).

120. Macpherson, I.
Stoker, M.
"Polyoma transformation of
Hamster cell clones, an
investigation of genetic fac-
tors affecting cell competence".
Virology. 16 147 - 151 (1962).
121. Majer, M.
Herrmann, A.
Hilfenhaus, J.
Mauler, R.
Lehmann, H. G.
Hennessen, W.
"A comparison of the Pasteur and
Pitman-Moore strains of rabies
virus for the production of
rabies vaccine in human diploid
cells".
J. Biol. Stand. 5 249 - 256 (1977).
122. Matsumoto, Seichi.
"Rabies virus"
Advances in Virus Research. 16
257 - 301, Academic Press (N. Y./
San Francisco/London) 1970.
123. Mean, F.
Steck, F.
Tanner, F.
"Humoral immunity conferred by
the HDCS rabies vaccine, Mérieux,
administered after exposure.
151 cases with and without
specific immune globulin of
human origin. Preliminary
communication.
Develop. biol. Standard. 40
159 - 161 (S. Karger Basel 1978).
124. Mirschamy, H.
"Sur la préparation et la concen-
tration du sérum antirabique en
Iran". Rev. Immunol. (Paris) 26
60 - 91 (1963).
125. Möller, G.
Wigzell, H.
"Antibody synthesis at the
cellular level".
J. Exp. Med. 121 969 - 989 (1965).

126. Mullbacher, A. "H-2 Linked control of cytotoxic
Blanden, R. V. T-cell responsiveness to Alpha-
virus Infection".
J. Exp. Med. 149 786 - 790 (1979).
127. Neurath, A. R. "Characterization of subviral
Vernon, S. K. components, resulting from
Dobkin, M. B. treatment of rabies virus with
Rubin, B. A. Tri (n-butyl) phosphate".
J. Gen. Virol. 14 33 - 48 (1972).
128. Nicolas, A. J. "Production of inactivated rabies
Patet, J. vaccine for human use on WI 38,
Vincent Falquet, J.C. diploid cells, Results of potency
Branche, R. tests. Stability of the vaccine in
Delaiti, P. liquid and freeze-dried forms".
Montagnon, B. Develop. biol. Standard. 40
Peyron, L. 17 - 24 (S. Karger Basel, 1978).
Soulebot, J. P.
129. Nicholson, K. G. "Immunization with a human
Turner, G. S. diploid cell strain of rabies
Aoki, F. Y. virus vaccine: Two year results".
J. Infect. Dis. 6 783 - 788 (1978).
130. Nicholson, K. G. "Studies with Human Diploid cell
Turner, G. S. strain rabies vaccine and human
antirabies immunoglobulin in man".
Develop. biol. Standard. 40
115 - 120 (S. Karger, Basel 1978).
131. Para, M. "An outbreak of post-vaccinal
rabies (Rage de Laboratoire)
in Fortaleza Brazil in 1960"
Bull. WHO 33 177 - 182 (1965).

132. Pasteur, L.
Chamberlain, M.
Roux, M.
"Nouveaux faits pour servir
la connaissance de la rage"
C. R. Acad. Sci. (Paris) 95
1187 - 1192 (1882).
- 133a. Pasteur, L.
"Methode pour prevenir la rage
après morsure".
C. R. Acad. Sci. (Paris) 101
765 - 775 (1885).
133. Peck, F. B. (jr)
Powell, H. M.
Culbertson, C. G.
"New Antirabies vaccine for
human use".
J. Lab. and clin. Med. 45
679 - 683 (1955).
134. Plotkin, S. A.
Clarke, H. F.
"Prevention of rabies in man"
J. Infect. Dis. 173 (2)
227 - 240 (1971).
135. Plotkin, S. A.
Wiktor, T. J.
Koprowski, H.
Rosanoff, E. I.
Tint, H.
"Immunization schedules for the
new Human Diploid cell vaccine
against rabies".
Am. J. Epidemiol. 103 (1) 75 -
80 (1976).
136. Powell, H. M.
Culbertson, C. G.
"Cultivation of fixed rabies
virus in embryonated duck eggs".
Public. Health. Rep. 65
400 - 401 (1950).
137. Proca, G.
Bobes, S.
"Antirabic immunization: living
vaccines and killed vaccines".
Bull. Hlth. Org. League of
Nations 9 79 (1940).
138. Rodriguez, José
Deinhardt, Friedrich
"Preparation of a semi-permanent
mounting medium for fluorescent
antibody studies".
Virology. 12 316 (1960).

139. Rowley, D. A. "Homeostasis of antibody formation
Fitch, F. W. in the adult rat".
J. Exp. Med. 120 987 - 1005 (1964).
140. Rubin, R. H. "Human rabies immune globulin".
Sikes, R. K. JAMA 224 (6) 871 - 874 (1973).
Gregg, M. B.
141. Sabeti, A. "Eches éloignées du traitement
Fathi, M. Ann. Inst. Pasteur. (Paris) 106
Bahmanyar, M. 307 - 310 (1964).
Baltazard, M.
142. Sanders, M. "Cultivation of Viruses".
Kiem, I. A. M. A. Archs. Path. 148 - 225
Langunoff, D. (1953).
143. Seligmann, E. B. (jr) "The NIH test for potency"
WHO Monogr. Ser. no: 23 ch 33,
279 - 286, "Laboratory Techniques
in rabies" (third edition, eds.
Kaplan, M., Koprowski, H. (1973)).
144. Selimov, M. "Results of the use of anti-
Bolhicij, L. rabies gamma globulin and
Semenova, E. vaccine in prophylaxis of rabies
Kobriniskij, G. in the Soviet Union".
Zmusko, L. J. Hyg. Epidem. Microb. and
Immunol. (Prague) 3 168 - 180
(1959).
145. Selimov, M. "Tissue culture antirabic
Aksenova, T. vaccine for human use"
Symp. Series immunobiol.
Standard. 1 377 (1966).

146. Selimov, M.
Aksenova, T.
- "Results of clinical trials of the Institute of Poliomyelitis tissue culture vaccine in an attempt at curative immunization of human beings".
Symposium on rabies Moscow (1969).
147. Selimov, M.
Gordienko, E.
- "Preparation of antirabies immunoglobulin of animal origin method used in the USSR".
WHO Monogr. Ser. no: 23 ch 38.
304 - 306 "Laboratory Techniques in Rabies" (third edition, eds. Kaplan, M., Koprowski, H.) 1973
- 148a. Selimov, M.
Aksenova, T.
Klyueva, E.
Gribencha, L.
Lebedeva, I.
- "Evaluation of the inactivated tissue culture rabies vaccine from the Vnukovo-32 strain. Results of its industrial production and field use for post-exposure immunization of man". Develop. biol. Standard. 40. 57 - 62 (S. Karger, Basel 1978).
148. Selimov, M.
Klyeva, E.
Aksenova, T.
Lebedeva, I.
Gribencha, L. F.
- "Treatment of patients bitten by rabid or suspected rabid wolves with inactivated tissue culture rabies vaccine and rabies gamma globulin".
Develop. biol. Standard. 40,
141 - 146 (S. Karger, Basel 1978).

149. Shah, U.
Jaswal, G. S.
Mansharamani, H.
Plotkin, S. A.
Wiktor, T. J.
"Trial of human diploid cell
rabies vaccine in human
volunteers".
Br. Med. J. 997 - 998 (1976).
150. Shanbron, E.
Lundak, R.
Walford, R. L.
"Long term plasmapheresis,
Effects on specific plasma
proteins". Transfusion 12 (3)
162 - 167 (1972).
151. Shimada, K.
"The last rabies outbreak in
Japan".
In "Rabies" ed. Y. Nagano and
F. M. Davenport.
University park. press 11 - 28
(1971).
152. Sikes, R. K.
Larghi, O. P.
"Purified rabies vaccine.
Development and comparison of
potency and safety with two human
rabies vaccines".
J. Immunol. 99 (3) 545 - 553(1967).
153. Sikes, R. K.
"Human rabies immune globulin".
Publ. Health. Rep. (Wash) 84
797 - 801 (1969).
154. Sikes, R. K.
Cleary, W. F.
Koprowski, H.
Wiktor, T. J.
Kaplan, M. M.
"Effective protection of monkeys
against death from street virus
by post-exposure administration
of tissue culture vaccine".
Bull. WHO 45 1 - 11 (1971).

155. Sikes, R. K. "Preparation of antirabies immunoglobulin of human origin" WHO. Monogr. Ser. no: 23 ch. 39, 307 - 313, Third edition, ed. Kaplan, M. M., Koprowski, H. (1973).
156. Smith, J. S.
Yager, P. A.
Baer, G. M. "A rapid tissue culture test for determining rabies neutralizing antibody".
ibid. Appendix 5 354 - 356 (1973).
157. Smolens, J.
Stokes, J.
Vogt, A. B. "Human plasmapheresis and its effects on antibodies".
J. Immunol. 79 434 - 439 (1957).
158. Smolens, J.
Vogt, A. B.
Crawford, M. N.
Stokes, J. (jr) "The persistence in the human circulation of horse and human tetanus antitoxins".
J. Pediat. 59 (6) 899 - 902 (1961).
159. Sokol, F.
Kuwert, E.
Wiktor, T. J.
Hummeler, K.
Koprowski, H. "Purification of rabies virus grown in tissue culture".
J. Virol. 2 (8) 836 - 849 (1968).
160. Soulebot, J. P.
Petermann, H. G.
Terré, J.
Brun, A.
Stellmann, C.
Tayot, J. L. "Potency Test for rabies vaccines"., Symp. Series. immunobiol. Standard. 21 332 - 342 (Karger Basel 1974).

161. Steck, F.
Spengler, G. A.
Hauser, R.
Kellar, H.
Wandeler, A. I.
"IgM and IgG antibody profiles
after immunization of man with
a HDCS vaccine (preliminary
communication)"
Develop. biol. Standard. 40
137 - 139 (S. Karger, Basel 1978).
162. Svet Moldjevsky,
"An allergen free antirabies
vaccine" Bull. WHO 32 47 - 58
(1965).
163. Thraenhart, O.
Kuwert, E. K.
"Enzyme Immunoassay for Demon-
stration of Rabies-virus anti-
bodies Immunization.
Lancet 2 399 - 400 (1977).
164. Thraenhart, O.
Kuwert, E. K.
"Kinetik der IgM- und IgG-
Tollwut virus-Antikörperbildung
bei Personen die nach dem Essener
postinfektionelle Immunisierungs-
schema mit HDCS-Vakzine gegen
Tollwut geimpft wurden".
Zbl. Bakt. Hyg. 1 Abt. Orig. A
245, 429 - 441 (1979).
165. Tierkel, E. S.
Sikes, R. K.
"Pre-exposure prophylaxis against
rabies comparison of regimens".
JAMA 201 911 - 914 (1967).
166. Tierkel, E. S.
"Historical review of rabies in
Asia".
In 'Rabies' ed. Nagano.Y, and
Davenport. F.Y. 3 - 35 (Univer-
sity of Tokyo Press, Tokyo 1971).

167. Tint, H.
Dobkin, M. B.
Rubin, B. A.
"A new tissue culture (Wi-38) rabies vaccine inactivated and disaggregated with Tri-(n)-butyl Phosphate".
Symp. Series immunobiol. Standard 21 132 - 144 (S. Karger Basel 1974).
- 168a. Tint, H.
Rosanoff, E. I.
"Clinical responses to T(n) BP-disrupted HDCS (Wi-38) Rabies vaccine".
Develop. biol. Standard. 37 287 - 289 (S. Karger, Basel) 1977,
168. Toro, G.
Vergara, I.
Román, G.
"Neuroparalytic accidents of antirabies vaccine with suckling mouse brain".
Arch. Neurol. 34 694 - 700 (1977).
169. Trejos, A.
Lewis, V.
Fuenzalida, E.
Larghi, O. P.
"Laboratory investigations of neuroparalytic accidents associated with suckling mouse brain vaccine". Ann. Immunol. (Inst. Past.) 125 C, 917 - 924 (1971).
170. Turner, G. S.
Aoki, F. Y.
Tyrrell, D. A. J.
Nicholson, K. G.
Hill, I. E.
"Human Diploid Cell strain rabies vaccine. Rapid prophylactic immunization of volunteers with small doses".
Lancet. 1 1379 - 1381 (1976).
171. Uhr, J. W.
Baumann, J. B.
"Antibody formation".
1. The suppression of antibody formation by passively administered antibody".
J. Exp. Med. 113 935 - 957 (1961).

- 172 a. Uhr, J. W. "Antibody formation".
Finkelstein, M. S. 4. Formation of rapidly and slowly sedimenting antibodies and immunological memory to Bacteriophage ØX 174.
J. Exp. Med. 117 457 - 477 (1963).
172. Uhr, J. W. "The Kinetics of antibody formation" Progr. Allergy 10 37 - 83
Finkelstein, M. S. (1967) (Karger, Basel/New York).
173. Varela-Diaz, V. M. "Laboratory investigations on
Imas, B. neuroparalytic accidents associated to suckling mouse brain
Soto, E. rabies vaccine".
Larghi, O. P. 2. Encephalitogenicity of murine
Cuba, Caparo, A. brain myelin preparations".
Fuenzalida, E. Ann. Immunol. (Paris) 125 C
925 - 938 (1974).
174. Veeraraghavan, N. "Scientific report for 1956".
In: Pasteur Institute of
Southern India, Coonoor,
Golden Jubilee Souvenir,
1907 - 1957, 77 (Madras 1957).
175. Westwood, J. "Transformation of normal cells
Macpherson, I. A. in tissue culture; its significance relative to malignancy and
Titmuss, D.H. virus vaccine production".
Br. J. Exp. Pathol. 38 138 (1957).

176. Wezel, van. A. L.
Steenis, van. G.
"Production of an inactivated
rabies vaccine in primary dog
kidney cells".
Develop. biol. Standard. 40.
69 - 75 (S. Karger Basel 1978).
177. World Health
Organization
Expert committee on rabies
second report.
WHO. Tech. Rep. Ser. no: 82
(1954).
178. World Health
Organization
Expert committee on rabies
fourth report.
WHO. Tech. Rep. Ser. no: 201
(1960).
179. World Health
Organization
Expert committee on rabies
Sixth report.
WHO. Tech. Rep. Ser. no: 523
(1973).
180. World Health
Organization
Report of a consultation on
rabies vaccine prepared in
Human Diploid Cell cultures
(Teheran, Iran, 5-8 May 1975).
Unpublished working document
VPH/75.3.
181. World Health
Organization
"Rabies in Europa".
Wkly Epidem. Rec. no: 53
61 - 68 (1978).
182. World Health
Organization
"Application of rabies vaccines
at reduced schedules".
Wkly. Epidem. Rec. no: 53
213 - 220 (1978).

183. World Health Organization
"Vaccine potency requirements for reduced immunization schedule and pre-exposure treatment". Develop. biol. Standard. 40 268 - 270 (S. Karger, Basel 1978).
184. World Health Organization
Consultation on cell culture rabies vaccines and their protective effect in man". Essen 5 - 7 March 1980.
185. Wiktor, T. J.
Fernandez, M. V.
Koprowski, H.
"Cultivation of rabies virus in Human Diploid Cell Strain WI 38" J. Immunol. 93 353 - 366 (1964).
186. Wiktor, T. J.
Koprowski, H.
"Successful immunization of primates with rabies vaccine prepared in human diploid cell strain WI 38". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118 1069 - 1073 (1965).
187. Wiktor, T. J.
Sokol, F.
Kuwert, E.
Koprowski, H.
"Immunogenicity of concentrated and purified rabies vaccine of tissue culture origin". Proc. Soc. Exp. Biol. 139 799 - 805 (1969).
188. Wiktor, T. J.
Lerner, R. A.
Koprowski, H.
"Inhibitory effect of passive antibody on active immunity induced against rabies by vaccination". Bull. WHO 45 747 - 753 (1971).

189. Wiktor, T. J.
"Tissue culture methods".
WHO. Monogr. Ser. 23 ch. 9
101 - 123 "Laboratory Tech-
niques in Rabies" ed. Kaplan, M.,
Koprowski, H. (1973).
190. Wiktor, T. J.
Plotkin, S. A.
Grella, D. W.
"Human cell culture rabies
vaccine".
JAMA 224 (8) 1170 - 1171
(1973).
191. Wiktor, T. J.
Plotkin, S. A.
Koprowski, H.
"Development and clinical
trials of the new human rabies
vaccine of tissue culture
(Human Diploid cell) origin.
Develop. biol. Standard. 40.
3 - 9 (S. Karger Basel 1978).
192. Winkler, Chr.
"Neurologische Komplikationen
nach Tollwutschutzimpfung mit
der Hempt-Vakzine",
Dtsch. Gesundh.-Wes. 19 921
(1964).
193. Winkler, W. G.
Schmidt, R. C.
Sikes, R. K.
"Evaluation of human rabies
immune globulin and homolo-
gous and heterologous anti-
body". J. Immunol. 102 (5)
1314 - 1321 (1969).
194. Winkler, W. G.
Anderson, L. J.
Holman, R.
"Clinical experience with
Wyeth laboratoris HDCS
rabies vaccine at the Centre
for Disease Control". Develop.
biol. Standard. 40 167 - 168
(S: Karger, Basel 1978).

195. Wright, A. I. "Waiting for rabies".
in the Medical Annual 1977/
1978 347 - 353. Eds. Sir Ronald
Bradley Scott, Sir James Trager.
(publish Bristol. John Wright.
1978).
196. Zinkernagel, R. M. "Ir-Genes in H-2 regulate
Althage, A. generation of anti-viral
Cooper, S. cytotoxic T cells Mapping to
Callahan, S. N. K or D and dominance of unrespon-
Klein, J. siveness".
J. Exp. Med. 148 592 (1978).

Anhang 1

Plasmaphereseschema: Anzahl der Plasmaspender (n=78) Gruppe A(B):4:1(37)
 Plasmapherese A B , Impfung↓

	0	1	2	3	4	6	7	8	9	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	27	28	29	30	34	35	36	37	41	42	43	44	48	49
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Plasmapherese

der

kg

Spender
 1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41

Anhang 2 Einzelne Antikörpertiter von Plasmaspendern und Nicht-plasmaspendern mittels des "Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)", Mäusneutralisationstest (MNT) und der Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR).
Titer sind als negativer $\log_{10}$ /0,1 ml (RFFIT) /0,03 ml (MNT) /0,05 ml (KBR) angegeben.
(0,00 = nicht nachweisbar, NT = nicht getestet, KS = kein Serum vorhanden).

Impf- linge	Test	Tage nach der 1. Vakzinedosis					
		0	7	14	35	42	49
Plasmaspender Gruppe A							
1.S.A.	RFFIT	0.0	0.0	1.82	ks	ks	ks
	MNT	0.0	0.0	0.80	"	"	"
	KBR	1.20	0.0	1.20	"	"	"
2.R.A.	RFFIT	0.0	1.05	2.48	2.83	ks	ks
	MNT	0.0	0.40	1.89	3.01	"	"
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.81	"	"
3.R.B.	RFFIT	0.0	0.94	2.66	3.46	3.25	2.83
	MNT	0.0	0.91	1.84	2.31	3.01	2.87
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.51	1.51	1.51
4.H.E.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	1.40	2.06	2.45	2.52
	KBR	0.0	0.00	0.00	1.81	1.20	1.51
5.H.Be.	RFFIT	0.0	1.40	2.62	2.94	2.76	2.55
	MNT	0.0	0.00	1.61	2.45	3.77	2.87
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.81	1.81	2.11
6.G.D.	RFFIT	0.0	0.84	2.17	2.80	2.97	2.69
	MNT	0.0	0.00	2.17	2.59	2.87	3.15
	KBR	1.20	1.20	1.20	1.51	2.11	1.81
7.F.F.	RFFIT	0.0	0.40	1.85	2.90	2.91	3.11
	MNT	0.0	0.00	1.19	2.87	2.17	2.10
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.81	1.81	2.11
8.A.F.	RFFIT	0.0	0.00	2.20	2.45	2.48	2.41
	MNT	0.0	0.00	0.00	2.17	2.03	2.31
	KBR	0.0	0.00	0.90	1.20	1.81	1.51
9.A.Fü.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	1.05	2.38	2.59	2.31
	KBR	0.0	0.00	0.90	2.11	2.11	1.81
10.H.F.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.0	1.54	2.45	1.89	2.17
	KBR	0.0	0.90	1.51	2.11	2.11	2.41
11.G.G.	RFFIT	0.0	0.0	1.40	1.99	2.41	2.45
	MNT	0.0	0.0	0.40	1.89	2.45	2.03
	KBR	0.0	0.0	0.00	1.51	1.51	1.51
12.O.Gü.	RFFIT	0.0	0.40	1.92	2.45	2.48	2.48
	MNT	0.0	0.00	0.91	1.16	1.57	1.89
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.51	1.51	1.51

Impf- linge	Test	Tage nach der 1. Vakzinedosis					
		0	7	14	35	42	49
13.F.G.	RFFIT	0.0	1.43	2.31	ks	2.80	ks
	MNT	0.0	0.0	0.91	"	1.47	"
	KBR	0.0	0.0	1.20	"	1.20	"
14.B.H.	RFFIT	0.0	0.0	1.47	1.99	2.03	1.96
	MNT	0.0	0.0	1.05	1.61	1.92	1.92
	KBR	0.0	0.0	1.81	1.81	1.51	2.11
15.W.K.	RFFIT	ks	0.40	1.75	2.13	2.24	2.31
	MNT	0.0	0.00	1.19	1.68	2.17	1.61
	KBR	ks	0.00	1.20	2.11	1.81	1.81
16.W.Ka.	RFFIT	0.0	0.40	1.05	1.99	1.82	1.82
	MNT	0.0	0.00	0.00	1.64	1.61	2.27
	KBR	0.0	0.00	0.90	1.51	1.81	1.20
17.T.K.	RFFIT	0.0	0.40	1.82	2.62	ks	2.59
	MNT	0.0	0.0	1.29	2.31	1.92	2.59
	KBR	0.0	0.90	1.51	1.81	2.11	1.81
18.N.K.	RFFIT	0.0	0.77	2.59	3.49	3.04	3.36
	MNT	0.0	0.00	1.64	3.15	2.87	2.87
	KBR	0.0	0.00	1.51	2.11	2.71	2.11
19.E.K.	RFFIT	0.0	0.87	1.99	2.52	2.80	2.73
	MNT	0.0	0.00	0.70	1.89	2.03	1.99
	KBR	0.0	0.90	0.90	1.20	1.81	1.20
20.S.K.	RFFIT	0.0	1.12	2.17	2.94	3.22	3.18
	MNT	0.0	0.00	0.77	1.71	1.89	1.75
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.20	1.81	1.51
21.A.A.	RFFIT	ks	1.22	2.34	3.11	2.80	2.73
	MNT	0.0	0.00	0.80	1.89	2.03	1.89
	KBR	0.0	0.00	0.90	1.81	1.81	1.51
22.K.L.	RFFIT	ks	1.15	2.55	3.11	3.04	3.01
	MNT	0.0	0.40	1.47	2.03	2.03	1.89
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.20	1.51	1.51
23.A.L.	RFFIT	ks	0.00	2.20	2.06	2.27	ks
	MNT	0.0	0.00	1.15	0.91	1.00	"
	KBR	0.0	0.00	0.90	0.90	1.20	"
24.M.M.	RFFIT	0.0	0.00	2.48	ks	ks	ks
	MNT	0.0	0.40	1.47	"	"	"
	KBR	0.0	0.00	1.51	"	"	"
25.J.N.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	1.05	0.91	1.75	2.31	2.17
	KBR	0.0	0.00	0.00	1.81	1.81	ab
26.H.N.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	0.98	1.85	2.03	ks
	KBR	0.0	0.00	1.51	2.11	1.20	1.51
27.P.O.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	0.40	1.61	2.06	2.17
	KBR	0.0	0.90	0.90	1.52	1.20	1.51

Impf- linge	Test	Tage nach der 1. Vakzinedosis					
		0	7	14	35	42	49
28.H.O.	RFFIT	ks	0.40	2.34	3.50	3.67	3.74
	MNT	0.0	0.00	0.77	1.75	1.93	2.06
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.81	2.11	1.81
29.R.P.	RFFIT	0.0	0.00	1.99	2.69	2.73	2.52
	MNT	0.0	0.40	0.40	1.19	2.17	1.61
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.51	1.81	1.81
30.W.S.	RFFIT	0.0	0.00	2.03	2.80	2.97	2.73
	MNT	0.0	0.00	1.40	1.89	2.31	2.27
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.81	ks	1.81
31.W.Sch.	RFFIT	0.0	0.40	2.03	1.89	1.99	2.66
	MNT	0.0	0.00	0.40	1.33	1.47	1.11
	KBR	1.2	1.20	1.51	1.81	2.11	1.81
32.K.Scho	RFFIT	0.0	0.40	1.61	1.96	1.92	1.78
	MNT	0.0	0.00	0.00	1.33	1.19	1.19
	KBR	0.0	0.00	0.00	1.20	1.51	1.20
33.U.S.	RFFIT	0.0	0.00	2.66	2.55	2.59	2.52
	MNT	0.0	0.00	1.70	2.31	2.20	2.20
	KBR	0.90	0.00	ks	1.81	1.81	1.81
34.G.T.	RFFIT	0.0	0.40	1.85	2.45	2.55	2.52
	MNT	0.0	0.00	1.33	1.47	2.31	2.87
	KBR	0.0	0.00	ks	1.81	2.11	2.11
35.O.V.	RFFIT	ks	0.40	2.17	2.48	2.34	2.34
	MNT	ks	0.00	1.19	1.19	2.03	1.71
	KBR	0.90	0.90	0.90	1.20	1.51	1.51
36.H.Wa.	RFFIT	0.0	0.00	1.50	2.03	2.10	2.34
	MNT	0.0	0.00	0.80	1.61	1.33	2.03
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.51	0.90	2.11
37.M.W.	RFFIT	0.0	0.94	2.48	2.87	3.22	2.94
	MNT	0.0	0.00	0.77	1.85	1.40	1.93
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.20	1.51	1.81
38.H.Wo.	RFFIT	0.0	0.00	1.12	1.85	1.82	1.96
	MNT	0.0	0.00	0.00	1.47	1.61	1.61
	KBR	0.0	1.20	1.51	1.51	2.11	1.20
39.B.W.	RFFIT	ks	0.94	1.61	2.48	2.34	2.27
	MNT	0.0	0.00	0.40	1.36	2.17	1.19
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.20	1.20	1.51
40.R.W.	RFFIT	ks	0.70	2.24	2.52	2.41	2.45
	MNT	0.0	0.00	0.77	1.61	1.89	1.75
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.81	1.81	1.81
41.B.K.	RFFIT	ks	0.00	ks	ks	ks	ks
	MNT	"	0.00	"	"	"	"
	KBR	"	0.00	"	"	"	"

Impf- linge	Test	Tage nach der 1. Vakzinedosis					
		0	7	14	35	42	49
Gruppe B							
1.J.B.	RFFIT	0.0	0.70	2.52	2.69	3.15	3.22
	MNT	0.0	0.40	1.98	2.80	3.01	3.18
	KBR	0.0	0.00	1.51	2.11	2.11	1.51
2.M.B.	RFFIT	0.0	1.29	2.41	3.01	3.15	3.22
	MNT	0.0	0.40	1.89	3.15	3.01	3.01
	KBR	0.0	ks	0.90	2.11	2.11	2.11
3.M.Be.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.00	0.40	2.24	2.45	2.73	2.45
	KBR	0.00	0.00	ks	1.20	1.51	3.01
4.L.B.	RFFIT	0.0	0.70	2.38	3.04	3.18	3.18
	MNT	0.0	0.00	1.85	2.17	1.75	2.59
	KBR	0.0	0.00	0.90	1.51	1.51	1.51
5.W.D.	RFFIT	0.0	0.91	2.52	2.90	3.11	3.08
	MNT	0.0	0.40	2.45	2.59	2.55	2.59
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.51	1.51	1.81
6.S.E.	RFFIT	ks	0.91	2.31	3.18	3.11	3.25
	MNT	0.0	0.40	1.61	3.15	2.73	2.73
	KBR	ks	0.00	1.20	2.11	1.81	2.11
7.U.E.	RFFIT	ks	0.00	1.29	2.45	2.55	2.73
	MNT	0.0	0.00	0.40	2.17	2.41	2.94
	KBR	0.0	0.00	0.90	2.11	2.11	2.71
8.L.E.	RFFIT	0.0	0.00	1.68	1.96	1.78	1.75
	MNT	0.0	0.00	0.91	1.43	1.47	2.17
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.51	1.20	1.20
9.C.G.	RFFIT	0.0	0.40	2.31	2.76	2.73	1.05
	MNT	0.0	0.00	1.61	2.55	2.45	2.87
	KBR	0.0	0.00	0.00	2.11	2.11	2.41
10.W.Gr.	RFFIT	ks	0.00	2.83	2.94	2.87	2.94
	MNT	0.0	0.00	1.05	2.31	2.73	2.45
	KBR	1.51	1.20	1.20	2.11	2.41	2.11
11.W.Ge.	RFFIT	ks	0.40	2.27	1.96	2.80	2.77
	MNT	0.00	0.00	0.91	1.50	2.31	1.61
	KBR	0.00	0.00	0.90	1.20	1.51	1.51
12.W.H.	RFFIT	0.0	1.47	2.27	3.04	2.94	2.83
	MNT	0.0	0.40	0.40	2.87	2.45	2.59
	KBR	0.0	ks	1.20	2.41	2.41	2.11
13.W.K.	RFFIT	0.0	0.00	2.41	2.62	2.52	2.69
	MNT	0.0	0.00	1.19	1.10	1.64	1.89
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.51	1.20	1.51
14.D.K.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	1.05	1.75	2.55	2.48
	KBR	0.0	0.00	0.90	1.51	1.20	1.51

Impf- linge	Test	Tage nach der 1. Vakzinedosis					
		0	7	14	35	42	49
15.B.K.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	1.85	2.45	1.75	2.13
	KBR	0.0	0.00	1.51	2.11	1.81	2.11
16.K.K.	RFFIT	0.0	0.0	1.43	2.45	2.83	ks
	MNT	0.0	0.0	0.91	1.89	2.45	"
	KBR	0.0	0.00	0.00	1.81	2.11	"
17.H.L.	RFFIT	0.0	0.40	1.82	2.73	2.59	2.59
	MNT	0.0	0.00	0.40	1.89	2.27	2.56
	KBR	0.0	0.90	1.20	1.81	2.11	2.11
18.A.L.	RFFIT	0.0	0.0	1.64	2.10	1.75	1.82
	MNT	0.0	0.0	0.40	1.40	1.75	1.75
	KBR	0.0	0.00	0.90	1.20	1.20	1.51
19.R.L.	RFFIT	ks	0.83	3.15	3.15	3.15	3.15
	MNT	0.0	0.00	1.82	2.62	2.97	2.80
	KBR	0.0	0.00	1.81	2.41	2.11	2.11
20.F.M.	RFFIT	0.0	0.87	2.73	3.08	2.97	3.18
	MNT	0.00	0.40	1.29	2.73	2.87	2.87
	KBR	0.00	0.00	1.20	1.81	2.11	2.11
21.G.M.	RFFIT	0.0	0.91	2.31	2.48	ks	ks
	MNT	0.0	0.00	0.91	2.17	"	"
	KBR	0.0	0.90	1.20	1.81	"	"
22.S.M.	RFFIT	0.0	0.00	2.27	2.45	2.76	2.76
	MNT	0.0	0.00	0.91	2.31	2.45	2.45
	KBR	0.0	1.81	1.20	1.81	2.11	2.11
23.H.R.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	0.40	2.45	1.20	2.31
	KBR	0.0	0.00	0.00	1.51	1.20	1.81
24.E.S.	RFFIT	ks	0.00	1.36	1.99	2.06	2.31
	MNT	0.0	0.00	0.40	1.89	1.92	2.55
	KBR	0.0	0.00	1.51	1.51	1.51	1.51
25.W.S.	RFFIT	0.0	0.77	1.64	2.69	2.76	2.06
	MNT	0.0	0.00	0.77	2.87	2.83	3.20
	KBR	1.20	0.90	1.81	2.11	2.11	2.41
26.W.Schu	RFFIT	0.0	0.91	2.66	ks	ks	ks
	MNT	0.0	0.00	0.40	"	"	"
	KBR	0.0	0.00	0.00	"	"	"
27.M.S.	RFFIT	0.0	0.0	2.03	2.90	2.94	2.52
	MNT	0.0	0.40	1.47	2.17	2.91	2.45
	KBR	0.0	0.00	1.51	2.41	2.41	1.81
28.J.S.	RFFIT	0.0	0.84	2.20	2.80	2.45	2.48
	MNT	0.0	0.00	1.19	2.03	2.40	1.61
	KBR	0.0	0.00	0.00	2.11	1.81	1.81
29.W.S.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.00	0.00	1.08	2.20	2.27	2.31
	KBR	0.0	0.00	1.20	2.11	2.11	1.81

Impf- linge	Test	Tage nach der 1. Vakzinedosis					
		0	7	14	35	42	49
30.R.S.	RFFIT	0.0	0.40	2.31	2.90	2.90	ks
	MNT	0.0	0.00	1.43	2.31	2.31	2.31
	KBR	0.0	0.00	1.20	2.11	2.41	2.11
31.K.S.	RFFIT	0.0	1.19	2.34	2.45	2.52	2.59
	MNT	0.0	0.00	1.19	1.84	2.03	2.17
	KBR	ks	0.90	1.81	1.81	1.51	2.11
32.N.S.	RFFIT	0.0	0.00	1.92	2.94	3.39	2.90
	MNT	0.0	0.00	0.00	1.15	1.75	2.13
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.20	1.51	ks
33.A.T.	RFFIT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	MNT	0.0	0.00	0.00	1.47	2.03	1.61
	KBR	0.0	0.00	0.90	1.20	1.80	1.51
34.H.W.	RFFIT	0.0	0.40	2.76	2.41	3.15	3.39
	MNT	0.0	0.00	0.40	1.61	1.89	1.57
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.81	2.11	1.81
35.D.W.	RFFIT	0.0	0.00	2.06	3.53	3.22	2.52
	MNT	0.0	0.00	0.40	1.75	2.45	2.31
	KBR	1.51	1.81	2.11	2.41	2.41	1.51
36.M.W.	RFFIT	0.0	0.84	2.24	ks	3.29	3.43
	MNT	0.0	0.00	1.05	"	1.89	2.59
	KBR	0.0	0.0	1.20	"	2.11	2.11
37.E.S.	RFFIT	0.0	0.40	2.17	2.87	2.97	ks
	MNT	0.0	0.0	1.19	2.17	2.45	2.17
	KBR	0.0	0.0	1.20	2.11	2.11	2.11

Kontrollen (kein Plasmaspender)

Gruppe A

1.J.F.	RFFIT	0.0	0.94	2.03	2.87	ks	ks
	MNT	0.0	0.00	1.12	2.31	"	"
	KBR	0.0	0.00	1.20	1.81	"	"
2.M.H.	RFFIT	ks	1.05	2.24	2.45	ks	ks
	MNT	"	0.06	1.47	1.89	"	"
	KBR	"	0.00	1.51	1.81	"	"
3.A.S.	RFFIT	ks	0.00	ks	ks	ks	ks
	MNT	"	0.00	"	"	"	"
	KBR	"	0.00	"	"	"	"
4.C.T.	RFFIT	ks	0.00	ks	ks	ks	ks
	MNT	"	0.00	"	"	"	"
	KBR	"	0.00	"	"	"	"
5.H.P.	RFFIT	ks	0.40	0.00	ks	ks	ks
	MNT	0.0	0.00	0.00	"	"	"
	KBR	ks	0.00	0.00	"	"	"

Impf- linge	Test	Tage nach der 1. Vakzinedosis					
		0	7	14	35	42	49
6.C.K.	RFFIT	ks	0.00	ks	ks	ks	ks
	MNT	"	0.00	"	"	"	"
	KBR	"	0.00	"	"	"	"

Gruppe B

1.U.Z.	RFFIT	0.0	0.00	1.15	1.85	ks	ks
	MNT	0.0	0.00	0.00	1.33	"	"
	KBR	0.0	0.00	0.00	1.20	"	"

Anhang 3

Absolute und relative (%) Anzahl der Plasmaspender der Gruppen A (n_1) und B (n_2, n_3) die am Tag 7, 14, 35, 42 und 49 nach der Erstimpfung (Tag 0) im "Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (RFFIT)" eine Antikörperkonzentration von ≥ 6 Internationale Einheiten aufwiesen.

Plasmaspender der Gruppe A				Plasmaspender der Gruppe B			
Tag	n	n_1	% (n)	Tag	n_2	n_3	% (n_2)
7	keine	35	0	7	keine	31	0
14	17	34	50	14	21	31	67,74
35	22	31	70,97	35	25	29	86,2
42	24	30	80,00	42	25	29	86,2
49	25	29	86,21	49	22	26	84,62

In verschiedenen Testsystemen (KBR, MNT, RFFIT) beobachtete Serokonversion von Kontrollpersonen und Plasmaspendern (Gruppe A und B) während und nach der HDCS-Vakzination.
 Impfschema: 4 Vakzinedosen am Tag 0, 7, 14, 35. Bei der Kontrollgruppe wurden die Gruppen A und B zusammengefaßt.

Serokonversion													
	Tag nach 1. Dosis	MNT			RFFIT			A			B		
		n	n ₁	%n ₁	n	n ₁	%n ₁	n	n ₁	%n ₁	n	n ₁	%n ₁
Plasma- spender	7	41	6	14,6	37	8	21,6	35	23	65,7	31	20	64,5
											n	n ₁	%n ₁
	14	40	36	90	37	35	94,6	34	34	100	31	31	100
											n	n ₁	%n ₁
	35	37	37	100	35	35	100	31	31	100	29	29	100
Kon- trolle	42	37	37	100	35	35	100	29	29	100	26	26	100
											n	n ₁	%n ₁
	49	34	34	100	35	35	100	29	29	100	26	26	100
											n	n ₁	%n ₁
	7	7	0	0				7	3	43			
Kon- trolle	14	4	2	50				4	3	75			
											n	n ₁	%n ₁
	35	3	3	100				3	3	100			

(n = Gesamtanzahl; n₁ = Anzahl der Serokonversion)

D a n k s a g u n g

1. Herrn Professor Dr. Ernst Kuwert für die Gelegenheit in seinem Institut zu arbeiten und für das Thema.
2. Der Minna-James-Heinemann Stiftung für die Gewährung eines Promotionsstipendiums für die Zeit von Mai 1979 - August 1980.
3. Herrn Dr. Jürgen Werner für seine freundliche Unterstützung und Beratung.
4. Firma Immuno GmbH, die ihre Plasmaspender für diese Studie zur Verfügung gestellt hatte.

Lebenslauf

- 1946 Geboren am 29. 05. als Tochter des Buch-
prüfers Bernard Barsenbach und seiner
Ehefrau, der Lehrerin Pansy-Adela geb.
Joseph verwitwete Barsenbach, in Colombo,
Sri Lanka
- 1951 Eintritt in die Primärschule
- 1957 Eintritt in die Sekundärschule
- 1961 Erwerb des General Certificate of
Education (Ordinary levels)
- 1964 Erwerb des General Certificate of Educa-
tion (Advanced levels)
- 1965 Nahm das Studium der Veterinärmedizin an
der Fakultät für Tiermedizin der Univer-
sität Sri Lanka auf.
- 1969 Staatsexamen und Abschluß des Studiums
der Tiermedizin mit dem Bachelor of
Veterinary Science
- 1970 Febr. - Regierungs-Tierärztin am Ministerium für
1976 Mai Animal Production and Health
- 1976 Juni - Grundkurs "Deutsch für Ausländer" am
1976 Sept. Goethe Institut in Schwäbisch Hall
- 1976 Okt. - Forschungsassistentin bei Herrn
- 1982 April Professor Dr. Ernst Kuwert am Institut
für Medizinische Virologie und Immuno-
logie der Universität - Gesamthochschule,
Essen

